

FACTOR IX/FACTOR IXa ANTIBODIES AND ANTIBODY DERIVATIVES**Publication number:** JP2003509049 (T)**Publication date:** 2003-03-11**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- international: *C12N15/09; A61K39/395; A61P7/04; C07K16/18; C07K16/36; C07K16/40; C12N5/10; C12N5/12; C12N5/20; C12N15/02; C12N15/13; C12P21/02; C12P21/08; C12N15/09; A61K39/395; A61P7/00; C07K16/18; C07K16/40; C12N5/10; C12N5/12; C12N5/20; C12N15/02; C12N15/13; C12P21/02; C12P21/08; (IPC1-7): C12P21/08; C12N15/09; A61K39/395; A61P7/04; C07K16/36; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/02*

- European: C07K16/40

Application number: JP20010523763T 20000913**Priority number(s):** AT19990001576 19990914; WO2000EP08936 20000913**Also published as:**

 WO0119992 (A2)
 WO0119992 (A3)
 US7033590 (B1)
 SK3662002 (A3)
 RU2002109586 (A)

more >>

Abstract not available for JP 2003509049 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0119992 (A2)**

An antibody or antibody derivative against factor IX/activated factor IX (FIXa) which increases the procoagulant activity of FIXa.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395			N 4 B 0 6 4
		A 6 1 P 7/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 7/04		C 0 7 K 16/36	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/36		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
		審査請求 有	予備審査請求 有 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-523763(P2001-523763)
 (86) (22) 出願日 平成12年9月13日 (2000.9.13)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年3月13日 (2002.3.13)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 0 0 / 0 8 9 3 6
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 1 9 9 2
 (87) 国際公開日 平成13年3月22日 (2001.3.22)
 (31) 優先権主張番号 A 1 5 7 6 / 9 9
 (32) 優先日 平成11年9月14日 (1999.9.14)
 (33) 優先権主張国 オーストリア (A T)

(71) 出願人 パクスター アクチェンゲゼルシャフト
 オーストリア国 ウィーン アー1221,
 インデュストゥリーシュトラッセ 67
 (72) 発明者 シャイフリンガー, フリードリッヒ
 オーストリア国 アー1090 ウィーン,
 ミヒェルボイエレンガッセ 4/17
 (72) 発明者 ケルシュバオマー, ランドルフ
 オーストリア国 アー1190 ウィーン,
 ペーター ヨルダン シュトラッセ 32
 -34/17
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 第 I X 因子 / 第 I X a 因子の抗体および抗体誘導体

(57) 【要約】

活性化された第 I X 因子 (F I X a) の凝血促進活性を増大する、第 I X 因子 / 活性化された第 I X 因子に対する抗体または抗体誘導体。本発明の第 I X 因子 / 第 I X a 因子-活性化抗体または抗体誘導体の作用は、インヒビター (例えば、第 V I I I 因子 / 第 V I I I a 因子に対するインヒビター) の存在によっては反対方向に影響されないが、代わりに、この場合は第 I X a 因子の凝血促進活性がまた増加される。本発明に従う調製物の投与は、F V I I I を抑制する患者の場合でさえも、第 V I I I 因子または第 V I I I a 因子の非存在においても迅速な血液凝固を可能とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第IX因子／第IXa因子に対する抗体または抗体誘導体であって、F IX aの凝血促進活性を増大させる、抗体または抗体誘導体。

【請求項2】 前記抗体または抗体誘導体が、F V I I Iインヒビターの存在下でF IX aの凝血促進活性を増大させる、請求項1に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項3】 前記抗体が、I g G抗体、I g M抗体、I g A抗体およびI g E抗体からなる群から選択される、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】 請求項1に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、該抗体または抗体誘導体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体、ダイアボディー、およびそれらのダイマー、オリゴマー、またはマルチマーからなる群から選択される、抗体または抗体誘導体。

【請求項5】 前記抗体誘導体が、相補的決定領域（CDR）ペプチドを含む、請求項1に記載の抗体誘導体。

【請求項6】 前記CDRペプチドがCDR3ペプチドである、請求項5に記載の抗体誘導体。

【請求項7】 請求項6に記載の抗体誘導体であって、ここで、前記CDR3ペプチドが、以下：

Ty r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r ;

C y s - X - X - T y r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r - X - X - C y s ;

T y r - G l y - A s n - S e r - P r o - L y s - G l y - P h e - A l a - T y r ;

A s p - G l y - G l y - H i s - G l y - T y r - G l y - S e r - S e r - P h e - A s p - T y r ; および

P h e - A r g - A s n - A r g - G l y - M e t - T h r - A l a - L e u - L e u - L y s - V a l - S e r - S e r - C y s - A s p 、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、
Xは、任意の所望のアミノ酸であり得る、抗体誘導体。

【請求項 8】 請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図 1 4 に記載のアミノ酸 1 ～ 3 5 7 および／またはアミノ酸 4 0 3 ～ 7 2 6 を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項 9】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項 8 に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 0】 請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図 1 5 に記載のアミノ酸 1 ～ 3 6 3 および／またはアミノ酸 4 0 9 ～ 7 4 7 を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 1】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項 1 0 に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 2】 請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体であって、ここで、
該抗体または抗体誘導体の可変領域が、図 1 6 に記載のアミノ酸 1 ～ 3 6 6 および／またはアミノ酸 4 1 2 ～ 7 4 7 を含む、抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 3】 前記抗体または抗体誘導体が、人工的なリンカー配列をさらに含む、請求項 1 2 に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 4】 請求項 1 に記載の、第 I X 因子／第 I X a 因子に対する抗体または抗体誘導体を発現する、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 1 5】 請求項 1 4 に記載のハイブリドーマ細胞株であって、ここで、
該細胞株が、# 1 9 6 / A F 1、# 1 9 6 / A F 2、# 1 9 3 / A D 3、# 1 9 3 / K 2 - 1、# 1 9 8 / A C 1 / 1、# 1 9 8 / A M 1、# 1 9 8 / A 1、# 1 9 8 / B 1、# 1 9 8 / A P 1、1 9 8 / A 1、1 9 8 / B 1、1 9 8 / B B 1、1 9 8 / A 1、1 9 8 / B 1、1 9 8 / B B 1 からなる群から選択される、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項 1 6】 請求項 1 4 に記載のハイブリドーマ細胞株によって発現される、請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体。

【請求項 1 7】 DNA 分子であって、該 DNA 分子が、請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体をコードする、DNA 分子。

【請求項 18】 請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的調製物。

【請求項 19】 第 I X a α 因子および／または第 I X a β 因子をさらに含む、請求項 18 に記載の調製物。

【請求項 20】 血液凝固障害に罹患した患者を処置するための方法であって、薬学的有効量の請求項 18 に記載の調製物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の方法であって、ここで、前記血液凝固障害が、血友病 A および出血性素質を含む群から選択される、方法。

【請求項 22】 血友病を抑制する患者を選択する工程をさらに包含する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 第 I X 因子／第 I X a 因子と相互作用し、そして第 I X a 因子の凝血促進活性を増大させる抗体または抗体誘導体を得る方法であって、以下の工程：

- － F I X、F I X a α 、F I X a β またはそれらのフラグメントからなる群から選択される抗原で、免疫応答性マウスを免疫する工程、
- － 免疫されたマウスの脾細胞を単離する工程、
- － ハイブリドーマクローンを産生する工程、
- － 第 I X a 因子の凝血促進活性における増大について、ハイブリドーマ細胞の上清をスクリーニングし、第 I X a 因子の凝固促進活性における増大を示すハイブリドーマ細胞の上清から、該抗体または抗体誘導体を単離および精製する工程、

を包含する、方法。

【請求項 24】 第 I X a 因子のアミド分解活性を増大させるための、請求項 1 に記載の抗体または抗体誘導体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、第IX因子／第IXa因子—抗体および抗体誘導体に関する。

【0002】

血餅（血栓）は、凝固カスケードと呼ばれる一連のチモーゲン活性化によって形成される。この酵素的カスケードの過程において、このようなチモーゲン（因子といわれる）の各々の活性化形態は、次のチモーゲンの活性化を触媒する。血栓は、血管壁の表面上の血液成分の蓄積物であり、そして主に、凝集した血小板および不溶性の架橋したフィブリンからなる。フィブリンの形成は、フィブリノーゲンの制限されたタンパク分解によって、トロンビンによってもたらされる。トロンピンは、凝固カスケードの最終生成物である（K. G. Mann, Blood, 1990, Vol. 76, pp. 1-16）。

【0003】

活性化された第IX因子（FIXa）および活性化された第VIII因子（FVIIIa）の複合体による第X因子の活性化は、凝固における重要な工程である。この複合体の成分の非存在またはその機能の妨害は、血友病と呼ばれる血液凝固障害に関連する（J. E. Sadler & E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, G. Stamatoyannopoulosら（編）: The molecular basis of blood diseases. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602）。血友病Aは、第VIII因子活性の（機能的）欠如を示すが、血友病Bは、第IX因子活性の欠如によって特徴付けられる。現在は、血友病Aの処置は、第VIII因子濃縮物の投与による補充療法を介してもたらされる。しかし、約20～30%の血友病Aの患者は、第VIII因子インヒビター（すなわち、第VIII因子に対する抗体）を発生させ、それによって投与された第VIII因子調製物の効果が阻害される。第VIII因子を抑制する患者の処置は、非常に困難かつ危険性を含み、そして従来はこれらの患者を処置するために限定された数の処置しか存在しなかった。

【0004】

低いFVIIインヒビターレベルを有する患者の場合において、高用量の第VII因子をこのような患者に投与して、従って第VII因子に対する抗体を中和することは、高価であるが可能である。次いで、インヒビター抗体を中和するために必要な量を超える量の第VII因子は、うっ血作用を有する。多くの場合において、脱感作がもたらされ得、次いでその上に、標準的な第VII因子処置を再び適用し得る。しかし、大量の第VII因子を必要とするこのような高用量第VII因子処置は多大な時間を必要とし、そして重篤なアナフィラキシーの副反応を伴い得る。あるいは、この処置は、ブタの第VII因子分子を用いて行われ得る。

【0005】

さらなる高コストの方法は、免疫グロブリン（プロテインA、プロテインG）または固定化された第VII因子に結合するレクチン上の、特別な体の免疫吸着（extra corporeal immunoadsorption）を介して第VII因子インヒビターを除去する工程を包含する。この処置の間、患者はアフエーシス器械に連結されなければならないので、この処置はまた、患者への大きな負担となる。この方法においてはまた、急性の出血を処置することとはできない。

【0006】

現在、最上の治療は、活性化されたプロトロンビン複合体濃縮物（APCC）（例えば、FEIBA（登録商標）およびAUTOPLEX（登録商標））を投与することであり、これは、高いインヒビター力価を有する患者においてでさえも、急性出血の処置に適切である（DE 31 27 318）。

【0007】

血液凝固の脈管内系において、最後の段階は第X因子の活性化である。この反応は、第VIIa因子の第IXa因子への結合、ならびに第IXa因子、第VIIa因子、第X因子およびリン脂質からなる「テナーゼ（tenase）」複合体の形成によって刺激される。FVIIaの結合なしでは、FIXaは酵素活性を示さないか、またはFXと比較してほんのわずかの酵素活性しか示さな

い。

【0008】

最近の数年にわたって、第IXa因子に対する第VIIa因子の可能な多くの結合部位が特徴付けられ、これらの領域に結合する抗体またはペプチドが、FIXaの活性を阻害することが示されている（Fayら、J. Biol. Chem., 1994, Vol. 269, pp. 20522-20527, Lentingら、J. Biol. Chem., 1996, Vol. 271, pp. 1935-1940, Jorqueraら、Circulation, 1992, Vol. 86, 抄録2725）。第IX因子のような凝固因子の阻害はまた、血栓症の形成の予防の目的で、モノクローナル抗体の使用を介して達成される（WO 97/26010）。

【0009】

逆の効果（すなわち、第X因子の第IXa因子媒介活性化における増大）は、第IX因子への第VII因子ペプチド（アミノ酸698〜712）の結合を介して、Liles D. K. ら、（Blood, 1997, Vol. 90, 補遺1, 2054）によって記載された。けれども、この効果は、第VIIa因子の非存在においてのみ生じ、一方、第VIIaの存在下では、第X因子の第IXa因子／第VIIa因子媒介切断は、このペプチドによって阻害される。

【0010】

（発明の要旨）

血友病患者の処置において生じ得る可能な危険性および副作用の観点から、FVIIを抑制する患者の有効な処置を可能にする治療の必要性が存在する。そのため、第VII因子を抑制する患者についての特定の利点を有する、血液凝固障害の処置のための調製物を提供することが本発明の目的である。

【0011】

本発明に従って、この目的は、第VIIa因子補因子活性または第IXa因子活性化活性を有し、そして第IXa因子の凝血促進活性における増加を導く、第IX因子／第IXa因子に対する抗体または抗体誘導体の使用を通して達成される。驚いたことに、本発明の第IX因子／第IXa因子-活性化抗体または抗

体誘導体の作用は、インヒビター（例えば、第ⅤⅢⅢ因子／第ⅤⅢⅢa因子に対するインヒビター）の存在によっては反対方向に影響されないが、代わりに、この場合は第ⅠⅩa因子の凝血促進活性がまた増加される。

【0012】

本発明のさらなる利点は、本発明に従う調製物の投与が、FⅤⅢⅢを抑制する患者の場合でさえも、第ⅤⅢⅢ因子または第ⅤⅢⅢa因子の非存在においても迅速な血液凝固を可能とすることである。驚いたことに、これらの因子はまた、第ⅤⅢⅢa因子の存在下においても有効である。

【0013】

従って、本発明に従う抗体および抗体誘導体は、FⅤⅢⅢ補因子様の活性を有し、これは、2時間のインキュベーション後のFⅤⅢⅢアッセイ（例えば、COATEST（登録商標）アッセイまたはイムノクロム（Immunochrom）試験）において、少なくとも3のバックグラウンド（基本的ノイズ）対測定値の比を示す。この比の計算は、例えば、2時間のインキュベーションの後に、以下のスキームに従って達成され得る：

【0014】

【数1】

抗体測定（OD 405）－因子からのブランク値 > 3

マウス-IgG-測定（OD 405）－因子からのブランク値

本発明に従う抗体は、好ましくは少なくとも5日、より好ましくは少なくとも10日のインビボ半減期を有するが、少なくとも20日の半減期を有するのがより好ましい。

【0015】

本発明のさらなる局面は、第ⅠⅩ因子／第ⅠⅩa因子に対する抗体および／または抗体誘導体、ならびに薬学的に受容可能なキャリア物質を含む調製物である。さらに、本発明に従う調製物は、第ⅠⅩ因子および／または第ⅠⅩa因子をさ

らに含み得る。

【0016】

本発明のさらなる局面は、第IXa因子のアミド分解 (amidolytic) 活性を増加するための、この抗体または抗体誘導体の使用である。

【0017】

(抗体および抗体誘導物)

本発明はまた、本発明の抗体および抗体誘導物、発現ベクター、ハイブリドーマ細胞株をコードする核酸、ならびにこれらを産生するための方法を包含する。

【0018】

抗体は、免疫グロブリン分子の合成 (または、それぞれ、その免疫原) を誘発する抗原にのみ結合する、あるいはその抗原に大変類似する抗原 (または免疫原) にのみ結合する、特異的なアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子である。各免疫グロブリン分子は、2つの型のポリペプチド鎖からなる。各分子は、大きな、同一の重鎖 (H鎖)、および2つの軽い、同一でもある鎖 (L鎖) からなる。ポリペプチドは、ジスルフィド架橋および非共有結合によって結合する。インビボでは、重鎖および軽鎖は、異なるリボソーム上で形成され、細胞内で組み立てられ、そしてインタクトな免疫グロブリンとして分泌される (Immunology, 第2版、1989内のRoitt I. ら)。

【0019】

本発明の抗体、および抗体誘導物、ならびにこれらから誘導された有機化合物は、ヒトおよび動物のモノクローナル抗体またはそれらのフラグメント、一本鎖抗体およびそれらのフラグメントならびにミニ抗体、二重特異的 (bispecific) 抗体、二重抗体 (diabody)、三重抗体 (triabody)、またはそれらのダイマー、オリゴマーもしくはマルチマー (multimer) を含む。本発明に従う抗体から誘導されたペプチドミメティックス (peptidomimetics) またはペプチド (例えば、これらは、1つまたはいくつかのCDR領域、好ましくはCDR3領域を含む) もまた含まれる。

【0020】

さらに、構造的活性関連に基づいて、人工的モデリングプロセスによって産生

されるヒトモノクローナル抗体およびペプチド配列も含まれる (Greer J. ら、J. Med. Chem.、1994、Vol. 37、pp. 1035-1054)。

【0021】

用語第IX/Xa因子活性化抗体および抗体誘導物はまた、宿主細胞内における、変更された、免疫グロブリンコード領域の発現によって産生されるタンパク質 (例えば、合成抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体のような「技術的改変抗体」、またはそれらの混合物、あるいは例えば、Fv、Fab、Fab' または F(ab)'₂ などの定常領域を部分的もしくは完全に欠損する抗体フラグメントを含み得る。これらの技術的改変抗体において、例えば、軽鎖および/または重鎖の一部またはいくらかの部分は、置換され得る。このような分子は、例えば、ヒト化重鎖および未改変軽鎖 (またはキメラ軽鎖) からなる抗体を含み得、逆も同様である。用語Fv、Fc、Fd、Fab、Fab' または F(ab)'₂ は、先行技術 (Harlow E. および Lane D.、「抗体、実験室マニュアル (Antibodies、A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory、1988) に記載されるように用いられる。

【0022】

本発明はまた、モノクローナル抗体 (mAb) から誘導される Fab フラグメントまたは F(ab)₂ フラグメントの使用を含み、これらのフラグメントは、第IX因子/第IXa因子に対して指向され、そして第IXa因子のプロコアギュラント (procoagulant) 活性の増加を引き起こす。好ましくは、異種のフレームワーク領域および定常領域は、ヒト免疫グロブリンクラスおよびアイソタイプ (例えば、IgG (サブタイプ1~4)、IgM、IgA および IgE) から選択される。免疫応答の過程において、免疫グロブリンのクラス変更 (例えば、IgMからIgGへの変更; ここでは、定常領域が (例えば、 μ から γ へ) 変換される) が起こり得る。先行技術 (Esser C. および Radbruch A.、Annu. Rev. Immunol.、1990、Vol. 8、pp. 717-735) から公知のように、クラス変更はまた、指向された様

式で、遺伝子操作方法（「指向されたクラス変更組換え」）によって引き起こされ得る。しかし、本発明に従う抗体および抗体誘導物は、免疫グロブリンタンパク質のヒト配列を特別に含む必要はない。

【0023】

ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体からの補体決定領域（CDR）を含み、この領域は、選択されたヒト抗体配列のフレームワーク領域に挿入される。しかし、ヒトCDR領域もまた使用され得る。好ましくは、ヒト軽鎖および重鎖における可変領域は、1以上のCDR変換によって技術的に変えられる。6つの全てのCDR、または6未満のCDRの種々の組み合わせを使用することもまた可能である。

【0024】

本発明に従うヒト化抗体は、好ましくは、ヒト抗体の構造、またはそのフラグメントの構造を有し、そして治療的適用（例えば、患者（好ましくは、第V I I I因子を抑制する患者）における凝固障害の処置）のために必要な特徴の組み合わせを含む。

【0025】

キメラ抗体は、ヒト免疫グロブリンからの重鎖および軽鎖の両方の鎖の定常領域と組み合わせて、非ヒト起原の重鎖および軽鎖のフレームワーク領域を含む、可変領域全体を含むという点で、ヒト化抗体と異なる。例えば、マウス配列およびヒト配列からなるキメラ抗体が産生され得る。本発明に従うと、抗体および抗体誘導物はまた、一本鎖抗体、またはミニ抗体（例えば、プロリンリッチ配列およびオリゴマー化（oligomerisation）ドメインに結合するscFvフラグメント（例えば、Pluckthun A. およびPack P.、Immunotechnology、1997、Vol. 3、pp. 83-105）、もしくは一本鎖Fv（sFv）（これは、一本のポリペプチド鎖内の抗体結合領域全体を組み込む）であり得る。例えば、一本鎖抗体は、オリゴヌクレオチドにV遺伝子を結合することによって形成され得、このオリゴヌクレオチドは、リンカー配列として構築されており、そして第1のV領域のC末端を第2のV領域のN末端と、例えば、V_H-リンカー-V_LまたはV_L-リンカー-V_Hの

配置で結合し；従って、両方とも (V_H および V_L) は、N末端ドメインを表し得る (Huston JSら、Int. Rev. Immunol.、1993、Vol. 10、pp. 195-217；Raag R. およびWhitlow M.、FASEB J.、1995、Vol. 9、pp. 73-80)。リンカー配列として使用され得るタンパク質は、例えば、150 Åまで、好ましくは80 Åまで、そしてより好ましくは40 Åまでの長さを有する。グリシンおよびセリンを含むリンカー配列は、これらの可撓性のために特に好ましく、または、グルタミンおよびリジンを含むリンカー配列は、それぞれ、これらの可溶性のために好ましい。アミノ酸の選択は、免疫原性および安定性の基準に従ってなされ、これらの一本鎖抗体が、生理学的適用または工業的適用（例えば、免疫アフィニティクロマトグラフィー）に適し得るか否かにも依存する。この一本鎖抗体はまた、凝集体として（例えば、トリマー、オリゴマー、またはマルチマーとして）存在し得る。しかし、リンカー配列はまた失われ、そして V_H 鎖および V_L 鎖の結合が直接起こり得る。

【0026】

二重特異性抗体は、1つの単一分子内に2つの異なった結合特異性を有する、高分子のヘテロ二機能性架橋である。この群には、例えば、二重特異性 (bs) IgG、bs IgM-IgA、bs IgA-二量体、bs (Fab')₂、bs (scFv)₂、ダイアボディー (diabodies)、およびbs bis Fab Fcが属する (Cao Y. およびSuresh M. R.、Bioconjugate Chem.、1998、第9巻、635-644頁)。

【0027】

ペプチド模倣物によって、天然ペプチド成分の構造を模倣するかまたはその鑄型が隣接したペプチド配列における特異的構造形成を誘導する低分子のタンパク質成分が理解される (Kemp DS、Trends Biotechnol.、1990、249-255頁)。ペプチド模倣物は、例えば、CDR3ドメインに由来し得る。所定のペプチド配列の系統的な変異分析、すなわち、アラニンまたはグルタミン酸走査変異分析によって、凝血促進性活性に重要なペプチド残

基の同定を可能にする。特定のペプチド配列の活性を改善するための別の可能性は、高い処理能力のスクリーニングと組み合わせたペプチドライブラリーの使用である。

【0028】

用語抗体および抗体誘導体はまた、構造-活性関係に関連するデータの分析によって獲得される因子を含み得る。これらの化合物はまた、ペプチド模倣物として使用され得る (Grassy G. ら、Nature Biotechnol. 1998, 第16巻、748-752頁; Greer J. ら、J. Med. Chem., 1994, 第37巻、1035-1054頁)。

【0029】

本発明に従って、抗体または抗体誘導体を発現するハイブリドーマ細胞の例としては、ブタペスト条約に従って、番号99090924 (#198/A1)、99090925 (#198/B1) および99090926 (#198/BB1) 下で1999年9月9日に、そして、番号99121614 (#193/A0)、99121615 (#196/C4)、99121616 (#198/D1)、99121617 (198/T2)、99121618 (#198/G2)、99121619 (#198/AC1) および99121620 (#198/U2) 下で1999年12月16日に寄託された。

【0030】

(産生の方法)

本発明の抗体は、先行技術から公知の方法によって調製され得る (例えば、慣例的なハイブリドーマ技術によってかまたはファージディスプレイ遺伝子ライブラリー、免疫グロブリン鎖混合の方法もしくはヒト化技術によって) (Harlow E. およびLane D., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。本発明の抗体および抗体誘導体の産生は、例えば、慣例的なハイブリドーマ技術によって行なわれる (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, HarlowおよびLane編、148-24

2頁)。本発明に従って、ヒトおよび非ヒト種（例えば、ウシ、ブタ、サル、ニワトリおよびげっ歯類（マウス、ラット））はまた、ハイブリドーマ技術のために使用され得る。通常、免疫競合B a l b / cマウスまたはF I X欠損マウスは、使用され得る（第I X因子欠損マウスは、ノースキャロライナ大学、Ch a p e l H i l lのDarrel S t a f f o r d博士より分譲され得る）。免疫化は、例えば、第I X因子、第I X a α 因子または完全に活性化された第I X a β 因子、またはそのフラグメントで影響され得る。

【0031】

ハイブリドーマ細胞の上清における抗体および抗体誘導体が第I X因子／第I X a因子に結合し、そして、第I X a因子の凝血促進性活性の増加の原因となるという事実を望んで、ハイブリドーマは選択される。凝血促進性活性の増加は、例えば、第V I I I因子様活性の測定のための先行技術から公知のアッセイ方法（例えば、色素形成（c h r o m o g e n i c）アッセイ）によって証明され得る。

【0032】

あるいは、本発明の抗体および抗体誘導体はまた、組換え産生方法によって産生され得る。そうする際、本発明に従う抗体のDNA配列は、公知の技術によって決定され得、そして、抗体DNA全体またはその一部は、適切な系で発現され得る。ファージディスプレイ、合成および天然ライブラリー、公知の発現系における抗体タンパク質の発現、またはトランスジェニック動物における発現を含むような組換え産生方法は、使用され得る（Jonesら、Nature, 1986、第321巻、522-525頁；Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual, 1996, Kayら編、127-139頁；米国特許第4, 873, 316号；Vaughan T. J. ら、Nature Biotechnology, 1998, 535-539頁；Persic Lら、Gene, 1997, 9-18頁；Ames R. S. ら、J. Immunol. Methods, 1995, 177-186頁）。

【0033】

組換え的に産生された抗体の発現は、慣例的な発現ベクターの方法（例えば、細菌ベクター（例えば、pBr322およびその誘導体）、pSKFまたは真核生物ベクター（例えば、pMSGおよびSV40ベクター））によって影響され得る。抗体をコードするこれらの配列は、複製、発現および宿主細胞からの分泌を調節する制御配列を提供され得る。これらの制御配列は、プロモーター（例えば、CMVまたはSV40）およびシグナル配列を含む。

【0034】

発現ベクターはまた、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子（DHFR）、ハイグロマイシン-B-ホストトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼなどの選択および増幅マーカールを含む得る。

【0035】

使用されるベクターの成分（例えば、選択マーカール、レプリコン、エンハンサーなど）は、慣例的な方法の手段によって商業的に獲得され得るかまたは調製され得る。このベクターは、例えば、哺乳動物細胞（CHO、COS、線維芽細胞など）、昆虫細胞、酵母または細菌（E. coli など）についての種々の細胞培養物における発現のために構築され得る。好ましくは、発現タンパク質の最適なグリコシル化を可能にするこれらの細胞が使用される。特に好ましいのは、CHO細胞またはSK-HePにおいて発現されるベクターpBax（参考、図17）である。

FabフラグメントまたはF(ab)₂フラグメントの産生は、先行技術から公知の方法に従って影響され得る（例えば、パパインおよび/またはペプシンなどのタンパク分解性酵素を使用して、mAbを切断することによってかまたは組換え法によって）。これらのFabおよびF(ab)₂フラグメントはまた、ファージディスプレイ遺伝子ライブラリーの方法によって調製され得る（Winterら、1994, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455）。

【0036】

抗体誘導体はまた、先行技術から公知の方法の手段によって調製され得る（例えば、Grassy G. ら、Nature Biotechnol., 199

8, 第16巻、748-752、またはGreer J. ら、J. Med. Chem., 第37巻、1035-1054頁、またはRees A. ら、「Protein Structure Prediction; A practical approach」Sternberg M. J. E. 編、IRL出版、1996、第7-10章、141-261頁からの分子モデリングによって）。

【0037】

本発明の抗体および抗体誘導体の精製はまた、先行技術で記載された方法によって行なわれ得る（例えば、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティー精製（プロテインGセファロース）、イオン交換クロマトグラフィー、またはゲルクロマトグラフィーによって）。本発明の抗体および抗体誘導体が、第IX因子／第IXa因子に結合し、第IXa因子の凝血促進性活性を増加するかまたは第VIII因子様活性を有することを示すための試験方法として、以下の方法は使用され得る：一工程凝血試験（MikaelssonおよびOswaldson, Scand. J. Haematol., Suppl., 33, 79-86頁、1984）または色素形成試験（COATEST VIII:C（登録商標）（Chromogenix）またはImmunochrom（IMMUNO）など）。原則的には、第VIII因子活性を決定するために使用される全ての方法が使用され得る。測定のコントロールブランク値として、例えば、非特定のマウスIgG抗体が使用され得る。

【0038】

本発明の抗体および抗体誘導体は、例えば、血友病Aの場合において、第VIII因子を抑制する患者などのための凝血障害の処置における治療的使用に適している。投与は、患者に治療学的因子を効果的に投与するのに適切な任意の方法によって、影響され得る（例えば、経口投与、皮下投与、筋内投与、静脈内投与または鼻腔内投与によって）。

【0039】

本発明に従う治療学的因子は、薬学的に受容可能なキャリア物質中に活性な因子として十分な量の抗体または抗体誘導体を含む調製物として産生され得る。これらの因子は、液体または粉末形態のいずれかで存在し得る。さらに、本発明に

従う調製物はまた、異なった抗体、その誘導体および／またはそれらから誘導された有機化合物の混合物、ならびに、抗体および第ⅠⅩ因子および／または第ⅠⅩa因子からなる混合物を含み得る。第ⅠⅩa因子は、第ⅠⅩa α 因子および／または第ⅠⅩa β 因子として存在し得る。水性キャリア物質の例は、例えば、生理食塩水である。溶液は滅菌性で、滅菌は慣例的な方法によって影響される。

【0040】

本発明に従う抗体または抗体誘導体は、貯蔵のために凍結乾燥形態で存在し得、そして、投与の前に適切な溶媒で懸濁され得る。この方法は、一般的に慣例的な免疫グロブリンについて有利であることが証明され、そして、公知の凍結乾燥および再構成方法は、この場合で適用され得る。

【0041】

さらに、本発明に従う抗体および抗体誘導体はまた、工業的適用に使用され得る（例えば、アフィニティークロマトグラフィーの方法による第ⅠⅩ因子／第ⅠⅩa因子の精製のためか、または検出方法（例えば、ELISAアッセイ）の成分としてか、または標的タンパク質の機能的ドメインの同定および相互作用のための因子として）。

【0042】

本発明は、以下の実施例および図面によって、より詳細に記載されるが、本発明はそれに対して制限されるべきではない。

【0043】

(実施例)

(実施例1：免疫競合マウスの免疫化および抗FⅠⅩ／ⅠⅩa抗体分泌ハイブリドーマ細胞の産生)

1～3匹の正常免疫競合5～8週齢Balb/cマウスを個体内(i. p.)経路を介して100 μ gの抗原(100 μ l用量)で免疫化した。代表的な実験では、マウスを組換えヒト凝血因子(F)ⅠⅩ(BenefixTM)、ヒト活性化FⅠⅩa α (Enzyme Research Laboratories, Lot: FⅠⅩa α 1190L)または水酸化アルミニウムもしくはKFAで補助したヒトFⅠⅩa β (Enzyme Research Laborato

ries, Lot: HFIX α 1332 AL) のいずれかで接種した。

【0044】

個々のマウスを100 μ gの抗原(100 μ l用量、i. p.)で種々の時間にブーストし、そして、2日後に屠殺した。脾臓細胞を取り出し、そして、Laneら、1985(J. Immunol. Methods, 第81巻、223-228頁)に基本的に記載されるように、P3 X63-Ag86. 5. 3骨髄腫細胞に融合させた。それぞれの融合実験を個々に番号付けした(すなわち、#193、195、196または198)。

【0045】

ハイブリドーマ細胞をマクロファージフィーダー層上の96ウェルプレート上で増殖し(約10⁵細胞/ml)そしてHAT培地(抗生物質、10%FCS、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、2-メルカプトエタノールおよびHAT(HAT 100 \times :H₂O中の1.0 \times 10⁻²Mヒポキサンチン(136.1mg/100ml H₂O)、H₂O中の4.0 \times 10⁻⁵Mアミノプテリン(1.76mg/100ml H₂O)およびH₂O中の1.6 \times 10⁻³Mチミジン(38.7mg/100ml H₂O))で補充したRPMI-1640培地)中で選択した。培地を6日後に最初に交換し、その後1週間に2回交換した。2-3週間後、HAT培地をHT培地(抗生物質、10%FCS、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、2-メルカプトエタノールおよびHTで補充したRPMI-1640)に変更し、その後(さらに1-2週間後)通常の増殖培地(10%FCS、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよび2-メルカプトエタノールで補充したRPMI-1640培地)(HYBRIDOMA TECHNIQUES、EMBO, SKMB Course 1980, Baselを参照のこと)に変更した。

【0046】

別のセットの実験において、FIX欠損C57B16マウス(Linら、1997、Blood, 90:3962)を免疫化および後に続くハイブリドーマ産生のために使用した。FIXノックアウト(k. o.)マウスは、内因性FIXを発現しないので、達成可能な抗(a)-FIX抗体スペクトルは、正常なBa

1b/cマウスと比較して異なっていることが推定される（耐性の欠如に起因して）。

【0047】

（実施例2：抗FIX/FIXa抗体分泌ハイブリドーマ細胞の上清におけるFVII様活性のためのアッセイ）

ハイブリドーマ細胞によって分泌される抗FIXa抗体のFVII様活性をアッセイするために、市販されている試験キットCOATEST VIII：C/4（登録商標）（Chromogenix）を使用した。アッセイは、以下の改変を使用して基本的に製造業者によって記載されるように行なった：

高い処理能力のスクリーニングを可能にするために、アッセイをマイクロタイタープレート型式に小規模化した。簡潔には、ハイブリドーマ上清の25μlのアリコートを、マイクロタイタープレート（Costar, #3598）ウェルに移し、そして、37℃に温めた。色素形成基質（S-2222）、合成トロンビンインヒビター（I-2581）、因子（F）IXaおよびFXを滅菌水中で再構築し、そして、FIXa/FXを、製造業者のプロトコルに従って、リン脂質で混合した。反応液当り、50μlのリン脂質/FIXa/FX溶液を25μlの塩化カルシウム（25mM）および50μlの基質/インヒビター反応混液と組み合わせた。反応を開始するために、125μlのプレミックスをマイクロタイタープレート中のハイブリドーマ上清に添加し、そして、37℃でインキュベートした。サンプルの405nmおよび490nmの吸光度を、Lab systems iEMS Reader MF™マイクロタイタープレートリーダーで、試薬ブランクに対して（MLW、ハイブリドーマ上清の代わりの細胞培養培地）種々の時間（30分～12時間）測定した。サンプルのFVII様活性を、GENESIS™ソフトウェアを用いて、希釈したFVII参照規準（IMMUNO AG #5T4AR00）の吸光度に対してサンプルの吸光度を比較することによって計算した。

ハイブリドーマ細胞培養物上清におけるFVII様活性のスクリーニングの結果を図1に示す。融合実験#193、#195および#196由来の選択される前のクローン（上記を参照のこと）を記載されるように、色素形成FVIIア

ッセイで調査した。クローン193/M1、193/N1および193/P1は、マスタークローン193/C0由来のサブクローンであった（以下を参照のこと）。マスタークローン195/10は融合実験#195に由来し、そして、クローン196/A0、196/B0および196/C0は、融合実験#196由来であった。代表的なスクリーニング実験において、単一の融合実験由来の約1000クローン（96ウェル中）は、FV I I I様活性についてスクリーニング前と同じであった。続いて、選択されたクローンを大規模に増殖し（3～5mlの上清）、そして、色素形成アッセイで再分析した。陰性コントロールとして、細胞培養培地をそれぞれのプレート（MLW）上でアッセイした。

【0048】

高いFV I I I様活性または有意なFV I I I様活性のどちらかを示すウェルをサブクロニング手順に供した。選択およびサブクロニングプロセスは、細胞株（すなわち、193/C0）を産生するIgGのスクリーニングおよびサブクロニングについて例示されるが、クローンを産生するIgM（すなわち、196/C0、以下を参照のこと、図5）について同一の方法を正確に行なった。

【0049】

選択プロセスを、10の96ウェルプレート上の単一融合実験由来の全てのハイブリドーマ細胞クローンを最初に播種することによって行ない、これによって、いわゆる「マスタープレート」を作製した。マスタープレート上の別々の位置（ウェル）は、通常、1つ以上のハイブリドーマ細胞クローン（通常3～15の異なったクローン）を含んだ。続いて、数千の細胞のみによって分泌された抗体を試験した。これらの細胞を、抗体産生に最適以下の条件下で増殖し、この条件は、瀕死の細胞において最も公知である。それで、上清における予想された特異的な抗F I X抗体濃度は、 10^{-12} ～ 10^{-14} Mの範囲であり得る。このことは、なぜインキュベーション期間が、標準的FV I I Iアッセイと比較して延長されなければならないかを説明する。

【0050】

マスタープレートのハイブリドーマ細胞培養物上清におけるIgG媒介性FV I I I様活性についてのスクリーニングの結果を、図2に示す。上清を、色素形

成F V I I I アッセイにおいて試験した。融合実験番号# 1 9 3 (F I X a αで免疫したB a I b / c マウス) の5番目のマスタープレートから誘導される結果を示す。吸光度を、3 7℃でのインキュベーションの4時間後に読み取った。E S位を、ブランク (MLW) より有意に高いF V I I I 様活性を示すと同定した。この細胞プールを、1 9 3 / C 0 と名付け、そしてさらにサブクロニングした (図3)。マスタープレートの各ウェルは、1つより多いハイブリドーマ細胞クローンを含むので、単一の陽性ウェルの細胞を、2 ~ 0. 2細胞 / ウェルの計算された細胞密度で、9 6 ウェルプレートにおいて、伸長およびプレートした。再度、その上清を、F V I I I 様活性について試験し、そして陽性位置を、サブクロニングのさらなるラウンドに供した。代表的に、均一な細胞集団を得るために、F V I I I 様活性を示す各クローンを使用して、3 ~ 4 ラウンドのサブクロニングを実施した。ここで、1 9 3 / C 0 サブクロンの色素形成アッセイの結果を示す。吸光度を、3 7℃での4時間のインキュベーション期間の後に、読み取った。A 6位およびD 5位は、かなりのF V I I I 様活性を示し、そしてそれぞれ、1 9 3 / M 1 および1 9 3 / P 1 と命名した。これら2つのクローンを、さらなるラウンドのサブクロニングに供した。ネガティブコントロールとして、単純細胞培養培地を、各プレートにおいてアッセイした (MLW (H 1))。

【0051】

小スケール (3 m l) ハイブリドーマ培養物における色素形成F V I I I 様活性とF I X - E L I S A 反応性との比較を、図4に示す。マスタークローン (またはサブクローン) がさらにサブクロニングされるべきか否かを決定する前に、クローンを3 ~ 5 m l のスケールで増殖し、そしてその上清を、再度チェックした。このグラフは、マスタークローン1 9 3 / C 0、および陽性と同定され、そして再チェックされた全てのそのサブクロンの、F I X 特異的E L I S A の結果およびF V I I I 様色素形成活性を示す。本明細書中に記載されるE L I S A および色素形成アッセイの読み取りの場合には、ブランク (色素形成試薬自体の吸光度) を減算した。クローン1 9 3 / M 1 をサブクロニングし、そしてクローン1 9 3 / V 2、1 9 3 / M 2 および1 9 3 / U 2 を得た。1 9 3 / P 1、

193/AB2および193/P2由来の第2ラウンドの他のクローンを、サブクローニングした。193/AF3、193/AB3および193/AE3は、193/AB2のサブクローンである。第3ラウンドの他のクローンが、193/P2から生じた。最後に、193/AF3 (→193/AF4)、AE3 (→193/AE4、193/AL4、193/AN4および193/AO4) ならびに193/AD3 (→193/AG4、193/AH4、193/AD4、193/AI4、193/AK4) を、サブクローニングした。

【0052】

各融合実験から、いくつかの(5~15)マスタークローン(マスタープレートから選択される)を同定し、そしてサブクローニングに供した。3ラウンドのサブクローニングの後に、大部分の細胞株は、ELISAおよび色素形成活性分析(図4を参照のこと)ならびにcDNA配列分析により示されるように、均一であった。特定のマスタークローンおよびその全てのサブクローンは、同じFIX/FIXa結合抗体を産生する。しかし、異なるマスタークローン由来のクローンの抗体タンパク質配列には、大きな差異が存在する(実施例11を参照のこと)。大部分のハイブリドーマ細胞株は、IgGサブクラスから抗体を発現する(すなわち、クローン#193、#198から、198/A1、198/B1、198/BB1のような)。しかし、本発明者らはまた、IgM抗体を発現するいくつかのクローンを、選択し得た。

【0053】

いくつかの重要なマスタークローンおよびサブクローンのハイブリドーマ上清の色素形成活性を、決定した。吸光度を、37℃での1時間30分および3時間30分のインキュベーション期間の後に、測定した(図5)。193番目の融合物由来の全てのクローンとは対照的に、クローン196/C0およびそのサブクローン196/AP2は、FIX/FIXa特異的IgM抗体を産生した。この抗体は、短時間のインキュベーションの後でさえも、強力な色素形成活性を示した。

【0054】

以下の細胞株を、ブダペスト条約に従って、European Collec

tion of Cell Cultures (ECACC) に寄託した：98/B1 (ECACC No. 99090925)；198/A1 (ECACC No. 99090924)；198/BB1 (ECACC No. 99090926)；193/AO (ECACC No. 99121614)；196/C4 (ECACC No. 99121615)；198/D1 (ECACC No. 99121616)；198/T2 (ECACC No. 99121617)；198/G2 (ECACC No. 99121618)；198/AC1 (ECACC No. 99121619)；および198/U2 (ECACC No. 99121620)。

【0055】

特定の抗体の生物学的特性の、より深い分析を行うために、FVIIII様活性を有する異なる抗体を発現する均一なハイブリドーマ細胞株を伸長し、そして目的の抗体をより大きなスケール（100～1000ml）で発現するために使用した。これらの抗体をアフィニティー精製し（実施例3を参照のこと）、その後、さらなる実験に使用した。

【0056】

（実施例3：FIX/FIXa活性化活性を示す抗体の第IX因子/FIXa（ α ， β ）結合特性）

第IX因子ならびにFIXの2つの活性化形態（FIXa α およびFIXa β ）（FIX/FIXa $_{(\alpha, \beta)}$ ）を、2g/mlの最終濃度まで、TBS（25mM Tris HCl、150mM NaCl、pH7.5）に希釈した。Nunc Maxisorp ELISAプレート（標準的な手順（4℃、一晚）に従って、100 μ lのFIX/FIXa $_{(\alpha, \beta)}$ 溶液でコートし、そしてTBST（TBS、0.1%（v/v）Tween 20）で数回洗浄した。50 μ lのハイブリドーマ上清を、50 μ l TBST/2% BSAで1：1に希釈し、コートしたELISAプレートに添加した。室温（RT）で2時間のインキュベーション期間の後に、プレートをTBSTで4回洗浄し、そして100 μ l/ウェルの抗マウスIgG（Fc特異的）ペルオキシダーゼ結合体化抗体（Sigma，#A-0168）の1：25000希釈物（TBST/1% BSA

中)とともにインキュベートした(2時間、RT)。ウェルを、TBSTで5回洗浄し、そして最後に、100 μ lの新たに調製した染色溶液(100 μ l OPD(60mg OPD/ml)および10 μ l 30% H₂O₂を補充した10mlの50mMクエン酸ナトリウム(pH5))で染色した。この反応を、50mlのH₂SO₄の添加により停止させ、そしてその光学密度を、492nmおよび620nmにおいて、GENESISTMソフトウェアを使用して、Lab systems iEMS Reader MFTMマイクロタイタープレートリーダーで記録した。

【0057】

特定の場合においては、抗マウスIgG ELISAの代わりに、抗マウスIgM ELISAを実施した。

【0058】

(ハイブリドーマ細胞培養物上清からのマウスIgGの精製)

ハイブリドーマ上清(100~500ml)に、200mM Tris/HCl緩衝液(pH7.0)および固体NaClを補充して、それぞれ20mM Trisおよび3M NaClの最終濃度を得た。次いで、この上清を、5500 \times gにおける10分間の遠心分離によって、清澄化した。1mlのプロテインGアフィニティークロマトグラフィーカラム(Protein G Sepharose Fast Flow, Amersham-Pharmacia)を、15mlの20mM Tris/Cl(pH7.0)で洗浄し、そしてその後、3M NaClを含む10mlの20mM Tris/Cl緩衝液(pH7.0)で平衡化した。次いで、この3M NaClを含むハイブリドーマ上清を、重力によってこのカラムに装填した。このカラムを、3M NaClを含む15mlの20mM Tris/Cl緩衝液(pH7.0)で洗浄した。結合したIgGを、12mlのグリシン/HCl緩衝液(pH2.8)でさらに溶出し、そして1mlの画分を収集した。中和のために、100 μ lの1M Tris(pH9.0)を、各画分に添加した。IgGを含む画分を、マイクロプレートのウェル内で、50 μ lを150 μ lの染色溶液(BioRad濃縮物、水で1:5に希釈)と混合することによって、同定した。陽性の画分を「プール」し、限外濾過

濃縮器デバイス (Centricon Plus 20, Amicon) によって、製造業者に従って、1ml に濃縮した。この濃縮物を、19ml TBS (150mM NaCl を含む 20mM Tris/Cl 緩衝液 (pH 7.0)) で希釈し、そして再度、1ml に濃縮した。IgG を TBS にするために、この希釈-濃縮工程を、さらに 2 回繰り返した。

【0059】

(ハイブリドーマ細胞上清からのマウス IgM の精製)

100~500ml のハイブリドーマ細胞培養物上清を、限外濾過濃縮器デバイス (Centricon Plus 20, Amicon) を用いて製造業者に従ってか、または硫酸アンモニウム沈殿 (40% 飽和、0℃) およびこの沈殿物の 5~10ml の TBS への再溶解によってかのいずれかで、5~10ml に濃縮した。いずれの場合においても、この濃縮物を、1.25M NaCl を含む 20mM Tris Cl 緩衝液 (pH 7.4) に対して透析し、そしてさらに、Centricon Plus 20 (Amicon) 限外濾過デバイスにおいて 1ml に濃縮した。IgM を、ImmunoPure IgM Purification Kit (Pierce) を用いて、製造業者に従って、この濃縮物から精製した。マルトース結合タンパク質カラムからの溶出の間に収集された画分を、IgM に関して試験し、プールし、濃縮し、そして IgG に関して記載したように、TBS にした。

【0060】

(精製した調製物における IgG 濃度の決定)

適切な希釈物の、全 IgG 内容物の 280nm 消光を、測定した。E280 = 1.4 は、1mg/ml のタンパク質に対応する。

【0061】

(第 IXa 因子特異的 IgG (定量的 ELISA))

マイクロプレート (Nunc Maxisorp) のウェルを、TBS (150mM NaCl を含む 25mM Tris/HCl (pH 7.5)) に希釈された 2μg/ml の第 IXa 因子とともに、4℃で一晩インキュベートした。ウェルを、TBST (150mM NaCl および 0.1% (v/v) Tween

20を含む25mM Tris/HCl (pH7.5))で4回洗浄した。標準モノクローナルABとして、FIX1抗FIX (精密)を使用した。標準およびサンプルを、2% (w/v) BSAを含むTBST中で希釈した。標準希釈系列およびサンプルの適切な希釈物を、ELISAプレート上で室温で2時間インキュベートした。プレートを、TBSTで4回洗浄し、そして抗マウスIgG (Fc特異的) ペルオキシダーゼ結合体化抗体 (Sigma、#A-0168) FIXaの100 μ l/ウェルの1:25000の希釈物 (TBST/1% BSA中) とともにインキュベートした (2時間、RT)。ウェルを、TBSTで5回洗浄し、そして最後に、100 μ lの新たに調製した染色溶液 (100 μ lのOPD (60mg OPD/ml) および10 μ lの30% H₂O₂を補充した10ml 50mMクエン酸ナトリウム (pH5)) で染色した。この反応を、50ml H₂SO₄の添加により停止させ、そして30分後、光学密度を、492nmおよび620nmにおいて、Labsystems iEMS Reader MFTMマイクロタイタープレートリーダーによって、GENESISTMソフトウェアを使用して、記録した。

【0062】

(実施例4: 色素形成FVIIアッセイにおいてFVII様活性を示す抗FIX/FIXa抗体)

いくつかの抗FIX/FIXa抗体産生ハイブリドーマクローンを、4回までサブクローニングし、そして得られるモノクローナルハイブリドーマ細胞株を使用して、モノクローナル抗体含有上清を産生した。これらの上清由来のIgGアイソタイプ抗体を、アフィニティーカラムで精製し、そしてTBSに対して透析した (上記を参照のこと)。IgM抗体を、精製していない上清画分として使用した。以下の実験を、以下の2セットの代表的な抗体を使用して行った: 193/AD3および198/AC1/1 (IgGアイソタイプ、抗体198/AC1/1は、親198/AC1ハイブリドーマクローンからの調製物であり、すなわち、198/AC1細胞を含む (凍結した) ウイルスが、培養され、そして抗体が産生される。次いで、この上清を、これらの実験のために使用する) ならびに196/AF2および196/AF1 (IgMアイソタイプ) (図6Aおよび図

6 B)。簡単に言えば、モノクローナル抗体を含むサンプル（精製されていないハイブリドーマ上清、または示される場合には、特定の量のF I X特異的抗体）の25 μ lのアリコート、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃に昇温させた。色素形成基質（S-2222）、合成トロンビンインヒビター（I-2581）、第I X a 因子（F I X a）およびF Xを、滅菌水中で再形成し、そしてF I X a/F Xを、供給者のプロトコルに従って、リン脂質と混合した。1反応あたり、50 μ lのリン脂質/F I X a/F X溶液を、25 μ lのCaCl₂（25mM）および50 μ lの基質/インヒビターカクテルと混合した。反応を開始させるために、125 μ lのプレミックス（p r e m i x）を、マイクロタイタープレート中のモノクローナル抗体溶液に添加し、そして37℃でインキュベートした。405 nmおよび490 nmにおける、サンプルの吸光度を、種々の時点において（5分～6時間）、試薬ブランク（ハイブリドーマ上清の代わりに細胞培養培地）に対して、L a b s y s t e m s i E M S R e a d e r M FTMマイクロタイタープレートリーダーによって、GENESISTMソフトウェアを使用して、読み取った。

【0063】

ヒトF V I I I（12および16mU/ml）、TBSならびに細胞培養培地と比較した、モノクローナル抗体193/AD3（I g Gアイソタイプ）および196/AF2（I g Mアイソタイプ）により示されるF V I I I様活性の時間経過を、図6 Aに示す。405 nmの波長において測定可能な光学密度の増加により判断する場合に、誘導期の後に、両方の抗体が、色素形成基質切断を生じる。

【0064】

ヒトF V I I I（16mU/ml）および10 μ g/mlのマウスI g Gと比較した、モノクローナル抗体198/AC1/1（I g Gアイソタイプ、10 μ g/ml）および196/AF1（I g Mアイソタイプ、精製されていない上清）により示されるF V I I I様活性の時間経過を、図6 Bに示す。405 nmの波長において測定可能な光学密度の増加により判断する場合に、誘導期の後に、両方の抗体が、色素形成基質切断を生じる。

【0065】

(実施例5：抗FⅠX／FⅠXa-抗体により示されるFⅤⅠⅠⅠ様活性は、第Xa因子を産生し、そしてリン脂質、FⅠXa／FXおよびCa²⁺に依存性である。)

第ⅤⅠⅠⅠ因子活性は、通常、色素形成アッセイおよび／またはAPTTに基づく凝固アッセイを用いて、決定される。両方の型のアッセイは、FⅤⅠⅠⅠa／FⅠXaにより媒介される第Xa因子産生に依存する。色素形成FⅤⅠⅠⅠアッセイの場合には、産生される第Xa因子は、引き続いて色素形成基質と反応し、これは、分光学的に(例えば、ELISAリーダーにおいて)モニタリングされ得る。APTTに基づく凝集アッセイにおいては、遊離の第Xa因子が、リン脂質表面におけるFⅤaと組み合わせ、いわゆるプロトロンビナーゼ複合体となり、そしてプロトロンビンをトロンビンへと活性化させる。トロンビンは、次に、フィブリン産生を生じ、そして最終的に、凝固の形成を生じる。これら2つのアッセイ系の中心は、FⅤⅠⅠⅠa／FⅠXa複合体による第Xa因子の産生である。

【0066】

抗FⅠX／FⅠXa-抗体により示されるFⅤⅠⅠⅠ様活性が実際に第Xa因子を産生することを実証するために、以下の実験を実施した。精製されていないハイブリドーマ上清196／AF2(IgMアイソタイプ)のいくつかの25μlのアリコート、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃まで昇温させた。ポジティブコントロールとして、16mUのRecombinateTMを、ハイブリドーマ培地(196 HM 007／99)中に希釈し、そしてハイブリドーマ上清と全く同じ様式で処理した。ネガティブコントロールとして、純ハイブリドーマ培地を使用した。色素形成基質(S-2222)合成トロンビンインヒビター(I-2581)第ⅠXa因子およびFXを、滅菌水中で再形成し、そしてFⅠXa／FXを、供給者のプロトコルに従って、リン脂質と混合した。Pefabloc Xa(登録商標)(第Xa因子特異的プロテイナーゼインヒビター)(Pentapharma, LTD)を、水で再形成して、最終濃度を1mM／lとした。1反応あたり50μlのリン脂質／FⅠXa／FX溶

液を、 $25\mu\text{l}$ の CaCl_2 (25mM) および $50\mu\text{l}$ の基質／トロンビンインヒビターカクテルと混合した。反応を開始させるために、 $125\mu\text{l}$ のプレミックスを、マイクロタイタープレート中のサンプルに添加し、そして 37°C でインキュベートした。示される場合には、 $35\mu\text{M}$ のPefabloc Xa (登録商標) を添加した。 405nm および 490nm における吸光度を、種々の時点において (5分ごと〜6時間ごと)、試薬ブランク (細胞培養培地) に対して、Lab systems iEMS Reader MFTMマイクロタイタープレートリーダーによって、GENESISTMソフトウェアを使用して、読み取った。

【0067】

色素形成基質S-2222の容易に測定可能な切断により判断する場合の、IgM抗FIX/FIXa抗体196/AF2により示されるFVII様活性による、第Xa因子の産生における第IXa因子刺激の結果 (「 16mU FVII 」と「 $196/AF2$ 」とを比較のこと) を、図7Aに示す。第Xa因子活性は、FXa特異的インヒビター「Pefabloc Xa (登録商標)」により効果的にブロックされ (「 $196/AF2$ 」と「 $196/AF2\ 35\mu\text{M Pefabloc Xa}$ (登録商標)」とを比較のこと)、このことは、実際にFXaが産生されたことを示す。

【0068】

同じ実験を、クローン198/AM1の精製したIgG調製物を使用して、実施した (図7B)。精製されたIgGをTBSで希釈し、最終濃度を 0.4mg/ml および $25\mu\text{l}$ (すなわち、合計 $10\mu\text{g}$) とし、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして 37°C に昇温させた。ポジティブコントロールとして、 6mU の血漿由来FVIIを使用した。 $10\mu\text{g}$ の非特異的マウスIgG (Sigma, I-5381) は、ネガティブコントロールとして作用した。このアッセイを、上記のように実施した。

【0069】

さらなる実験は、容易に測定可能な色素形成基質S-2222の切断により判断する場合に、IgG抗FIX/FIXa抗体198/AM1により示されるF

V I I I 様活性による第 I X a 因子の刺激が、第 X a 因子を産生することを示す (図 7 B)。再度、第 V I I I 因子および抗体 1 9 8 / A M 1 は、F X a を産生し、これは、F X a 特異的インヒビター「P e f a b l o c X a (登録商標)」によって効果的にブロックされる。ネガティブコントロールとして、非特異的マウス I g G (S i g m a , I 5 3 8 1) をアッセイした。

【 0 0 7 0 】

別のセットの実験において、精製した抗 F I X / F I X a 抗体 (I g M、図 8 A) または細胞培養物上清由来の精製していない抗体 (I g G、図 8 B) のいずれかの F V I I I 様活性の、リン脂質 (P L)、F I X a / F X および $C a^{2+}$ の存在への依存を、実証した。マウス I g G を、コントロールとして使用した (図 8 C)。第 V I I I 因子様活性を、本質的に上に記載のように、アッセイした。示される場合には、F I X a / F X 混合物、P L または $C a^{2+}$ のいずれかを、その反応から省略した。4 0 5 n m および 4 9 0 n m における、サンプルの吸光度を、種々の時点において、試薬ブランク (精製された抗体の代わりに緩衝液) に対して、L a b s y s t e m s i E M S R e a d e r M FTM マイクロタイタープレートリーダーで読み取った。その結果を図 8 A、図 8 B および図 8 C に示す。

【 0 0 7 1 】

精製された抗 F I X a 抗体 1 9 8 / A C 1 / 1 (I g G アイソタイプ、このアッセイを通して使用された濃度は $10 \mu g / m l$ であった) の、リン脂質 (P L)、F I X a / F X、および $C a^{2+}$ の存在下における F V I I I 様活性の依存性をさらに、図 8 A に示す。容易に認識可能であるように、競合的アッセイ (抗体、P L、 $C a^{2+}$ および F I X a / F X を含む) のみが、穏当な F X a 生成を引き起こす。リン脂質、F I X a / F X、および $C a^{2+}$ の存在下における不純 I g M アイソタイプ抗 F I X / F I X a 抗体 (1 9 6 / A F 1) を含む細胞培養上清の F V I I I 様活性の依存性を、図 8 B に示す。

【 0 0 7 2 】

重ねて、精製された I g G 調製物について既に示されたように (図 8 A)、抗体 1 9 8 / A C 1 / 1 は、競合的アッセイ (P L、 $C a^{2+}$ および F I X a / F X

を含む)のみが、穏当な量のFⅩa生成を引き起こす。反応の特異性を実証するために、正常なマウス血漿から調製された総IgGを、上記と同じ条件下でアッセイした。この結果を、図8Cに示す。いかなるFⅤⅢⅢ様活性も検出されなかった。予期されたように、リン脂質、FⅩa/FⅩ、およびCa²⁺の不在下において検出可能な活性は存在しない。すべての実験をマイクロタイタープレートにおいて実施し、そしてOD405を、6時間にわたって5分毎に走査した。

【0073】

(実施例6：特定の抗FⅩ/FⅩa抗体は、FⅩaの存在下において凝血原である)

正常なホメオシスの間、FⅩはまず、組織因子(TF)/第ⅤⅢa因子経路によってか、または後に活性化第Ⅹ因子(FⅩa)によってかのいずれかで活性化となる。その活性化後、FⅩaは、活性化FⅤⅢⅢとの膜結合複合体において、血小板表面上で会合する。第Ⅹa因子は単独では、FⅩに対する酵素活性をほとんどまたは全く有さないが、FⅤⅢⅢaの存在下では、高度に活性となる。特定の抗FⅩ/FⅩa抗体が、FⅤⅢⅢ様活性を有し、従って、FⅤⅢⅢを欠損したヒト血漿における凝血原であることを実証するために、以下の実験を行った。異なる量の抗体193/AD3またはマウスIgG(コントロールとして)を、標準的なaPTTに基づく一段階凝固アッセイにおいて使用した。簡潔には、100μlの抗体含有サンプルを、100μlのFⅤⅢⅢⅢ欠損血漿(DP)および100μlのDAPTTIN(活性化された тромбоプラスチンの時間を決定するためのPTT試薬; IMMUNO AG)試薬と共に、KC10A凝固分析装置においてインキュベートした。示された場合では、総量50ngの活性化FⅩを、反応混合物中に含ませた。4分間のインキュベーション後に、100μlのCaCl₂(25mM)を添加することによって、反応を開始した。この結果を、表1および図9に示す。

【0074】

【表1】

凝固時間 (秒)

μg AB	193/AD3	マウス IgG
	50ng FIXa	50ngFIXa
9	101.6	102.5
4.5	95.6	103.2
2.25	93.1	103.2
1.8	93.7	101.9
1.35	91.4	103.4
0.9	94.4	102.2
0.45	98.1	101.9
0.34	97.1	103.9
0.23	99.3	103.7

表1：50ngの活性化FIX (0.01UFIX)の存在下で、種々の量の凝血原 (193/AD3) およびコントロール抗体 (マウスIgG) を使用するAPTTに基づく凝固アッセイにおけるFVII欠損血漿の凝固時間。反応および活性化FIXにおける抗体のモル比は、10:1である。抗体と総FIX (FIXおよびFIXa、ヒトFVII欠損血漿が1U (5 μg) のFIXを含むと仮定) との間のモル比は、6:1 (反応における9 μg の抗体) と1:6 (反応における0.23 μg の抗体) との間で変動する。凝固時間の最適な短縮化に際して、抗体と総FIXとの間のモル比は、1:1である。FIXaの添加を伴わない凝固時間は、120秒間の範囲である。

【0075】

図9は、50ngの活性化FIXの存在下で、種々の量の凝血原 (193/AD3) およびコントロール (マウスIgG) 抗体を使用するAPTTに基づく凝固アッセイにおけるFVII欠損血漿の凝固時間のグラフ表示である。抗体193/AD3を補充したサンプルには、明らかな凝固時間の用量依存的減少が存在する。これらの結果は、抗体193/AD3が、FIXaの存在下において凝血原であることを意味する。

【0076】

(実施例7：抗FIX/FIXa抗体は、FVIIインヒビターおよびFI

Xaの存在下において凝血原である)

標準的なFVⅢ置換療法の重篤な合併症が、FVⅢに対する同種抗体の発達であり、これは、FVⅢの中和へと導き、そして患者の血液が凝固しないという状態に導く。

【0077】

特定の抗FIXa抗体が、FVⅢインヒビターの存在下においてさえ、FVⅢ様活性を有するということを実証するために、以下の実験を行った。異なる量の抗体193/AD3またはコントロールとしてのマウスIgGを、標準的なAPTTに基づく一段階凝固アッセイにおいて使用した。簡潔には、100μlの抗体サンプルを、100μlのFVⅢ欠損血漿(図10A)またはFVⅢインヒビター血漿(インヒビター効力400BU/ml)(図10B)のいずれか、および100μlのDAPTTIN試薬と共に、KC10A凝固分析装置においてインキュベートした。さらに、総量50ngの活性化FIXaを、反応混合物に含ませた。4分間のインキュベーション後に、100μlのCaCl₂(25mM)を添加することによって、反応を開始した。等価な条件を確実にするために、FVⅢ欠損血漿およびFVⅢインヒビター血漿を使用する実験を、並置して実施した。この結果を、図10Aおよび10Bに示す。実施例6において既に示したように、FVⅢインヒビターの存在下で抗体193/AD3を補充したサンプルには、明らかな凝固時間の用量依存的減少が存在する。

【0078】

(実施例8:抗FIX/FIXa抗体は、欠損性FVⅢおよびFIXaの存在下において凝血原である)

特定の抗FIXa抗体が、欠損性FVⅢの存在下においてFVⅢ様活性を有することを実証するために、以下の実験を実施し得る。漸増量の抗体193/AD3、またはコントロールとしてのマウスIgGを、標準的なaPTTに基づく一段階凝固アッセイにおいて使用する。この凝固アッセイでは、欠損性FVⅢ(DF8)の存在に起因して非常に低い凝固活性を有する血友病Aの患者の血漿を、使用する。簡潔には、100μlの抗体サンプルを、100μlの

DF8血漿またはFV I I I欠損性血漿のいずれか、および100 μ lのDAPTIN試薬と共に、KC10A凝固分析装置においてインキュベートする。さらに、総量50 ngの活性化F I X aを、反応混合物に含ませた。短期間のインキュベーション後に、100 μ lのCaCl₂ (25 mM) を添加することによって、反応を開始した。等価な条件を確実にするために、FV I I I欠損血漿およびDF8血漿を使用する実験を、並置して実施する。

【0079】

(実施例9：F I X aの存在下において凝血原活性を有する抗F I X/F I X a抗体は、ヒトF I X aとウシF I X aとの間を識別する)

198回目の融合実験から選択されたF I X/F I X a特異的モノクローナル抗体を、個々のハイブリドーマ上清から精製し、そして実施例3に記載のように定量した。これらの抗体を、改変された段階凝固アッセイ（実施例6に記載のような）において分析した。そしていくつかは、凝血原活性を示した。

【0080】

これらの抗体調製物の色素形成活性を、以下のF X a生成動力的アッセイにおいて測定した：10 μ gのモノクローナル抗体（25 μ l中）を、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃まで加温した。色素形成基質（S-2222）、合成トロンビンインヒビター（I-2581）、第I X a因子、およびF Xを、滅菌水中で再構築し、そしてF I X a/F X（両方ともウシ）を、供給業者のプロトコールに従って、リン脂質と混合した。反応につき、50 μ lのリン脂質/F I X a/F X溶液を、25 μ lのCaCl₂ (25 mM) および50 μ lの基質/インヒビター反応混液と組み合わせた。反応を開始するために、125 μ lのプレミックスを、マイクロタイタープレート中におけるモノクローナル抗体溶液に添加し、そして37℃でインキュベートした。サンプルの405 nmおよび490 nmでの吸光度を、GENESISTMソフトウェアを使用するLab systems iEMS Reader MFTMマイクロタイタープレートリーダーにおいて、試薬ブランク（モノクローナル抗体の代わりに、25 ml TBS）に対して種々の時点（5分間～2時間）で読み取った。並行して、反応あたり50 ngのヒトF I X aを添加したことを除いて、同じ反応を実施

した。凝血原活性を示したこれらの抗体は、ウシF I Xの場合では色素形成活性を有さなかったが、ヒトF I X aが存在した場合では、高い活性を示した。

【0081】

図11は、50ngのヒトF I X a β の添加あり(+)および添加なし(-)でモノクローナル抗体198/A1、198/B1、および198/AP1によって示されたF V I I I様活性の時間経過を示す。非特異的ポリクローナルマウスI g Gを、コントロールとして使用した。198/A1および198/B1は、凝血原活性を示す(実施例6における198/AD3と類似)が、198/AP1は示さない。抗体198/BB1は、同じ活性パターンを有した(データは示さず)。

【0082】

198回目の融合実験から選択された、さらなるモノクローナル抗体としては、198/D1 (ECACC番号 99121616)、198/T2 (ECACC番号 99121617)、198/G2 (ECACC番号 9912118)、198/U2 (ECACC番号 99121620)が挙げられる。

【0083】

(実施例10:抗F I X/F I X a抗体から誘導された抗体誘導体の構造および凝血原活性;ハイブリドーマ細胞株193/AD3、193/K2、198/A1および198/B1(クローンAB2)からの抗体可変ドメインのサブクローニング)

クローニング手順:「QuickPrep (登録商標) Micro mRNA Purification Kit」(Pharmacia)を製造業者の指示書に従い使用して、メッセンジャーRNAを、個々の細胞株(193/AD3、193/K2、198/A1または198/B1(クローンAB2)のいずれか)の 1×10^6 個のハイブリドーマ細胞から調製した。対応するcDNAを、「Ready-To-Go-You-Prime-First-Strand Beads kit」(Pharmacia)を製造業者の指示書に従い使用して、mRNAのレトロ(retro)転写によって生成した。重鎖および軽鎖をコードする配列を、プライマーセットを使用して、対応するcDNAに変換した。

重鎖特異的mRNA (VH) を逆転写するために、以下のオリゴヌクレオチドの等モル混合物を使用した (RTmix1) : MOCG1-2FOR (5' CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC 3') (配列番号1)、MOCG3FOR (5' CTC GAT TCT CTT GAT CAA CTC AGT CT 3') (配列番号2) および、MOCMFOR (5' TGG AAT GGG CAC ATG CAG ATC TCT 3') (配列番号3)。同じ反応チューブにおいて、軽鎖特異的cDNA (VL) を、プライマーMOCKFOR- (5' CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT GAC 3') (配列番号4) を使用して合成した。

【0084】

VHについてのコード配列を、図12に示したプライマーセットおよびテンプレートとして上記の逆転写混合物 (RTmix1) 由来の特異的cDNAを用いるPCRによって増幅した。VK鎖遺伝子を、図13に示したプライマーセットを使用し、そしてまたテンプレートとしてRTmix1を用いて増幅した。VH-PCR産物を、SfiI-AscIで切断し、そしてSfiI-AscIで消化したベクターpDAP2 (GeneBank登録番号: U35316) に挿入した。これにより得られたpDAP2-VH構築物を、それぞれ、pDAP2-193AD3/VH、pDAP2-198A1/VH、pDAP2-198AB2/VH (抗体198/B1由来) およびpDAP2-193/K2/VHと命名した。引き続き、プラスミドをAscI-NotIで切断し、そして対応するAscI-NotI消化されたVK遺伝子のPCR産物を挿入した。結果として生じたベクターをpDAP2-193/AD3scFv、pDAP2-198/A1scFv、pDAP2-198/AB2scFv (抗体198/B1由来) およびpDAP2-193/K2scFvと命名した。これらは、モノクローナル抗体193/AD3、198/A1、198/AB2 (抗体198/B1由来) および193/K2のVH遺伝子およびVL遺伝子をコードする。重鎖および軽鎖を、人工的可撓性リンカー (G₄SGGRASG₄S; Engelhardtら, 1994) についてのコード配列に連結し、そして個々の抗体のscFv

改変体の発現を可能にする。

【0085】

図14では、ハイブリドーマ細胞株193/AD3由来のs c F vのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～357は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド358～402は、人工の可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド403～726は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列YGNSPKGFAY（配列番号5）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G₄SGGRASG₄S）を示す。

【0086】

図15では、ハイブリドーマ細胞株193/K2由来のs c F vのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～363は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド364～408は、人工の可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド409～747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3のタンパク質配列は、配列DGGHGYGSSFDY（配列番号6）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G₄SGGRASG₄S）を示す。

【0087】

図16では、ハイブリドーマ細胞株198/AB2（抗体198/B1由来）由来のs c F vのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～366は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド367～411は、人工の可撓性リンカーをコードし、そしてヌクレオチド412～747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列EGGGFTVNWYFDV（配列番号7）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G₄SGGRASG₄S）もまた示す。

【0088】

図17では、ハイブリドーマ細胞株198/A1由来のs c F vのDNAおよび推定タンパク質配列を示す。ヌクレオチド1～366は、重鎖可変ドメインをコードし、ヌクレオチド367～411は、人工の可撓性リンカーをコードし、

そしてヌクレオチド412～747は、軽鎖可変領域をコードする。重鎖のCDR3領域のタンパク質配列は、配列EGGGYYVNWYFDV（配列番号8）を有し、そしてボールドの文字で提供される。人工のリンカー配列（G₄SGGRASG₄S）もまた示す。

【0089】

（実施例11：抗FIX/FIXa抗体のCDR3領域由来のペプチドの凝血原活性）

原理上、抗体分子は、三次元空間におけるペプチドエレメントのコンビナトリアルアレイの提示のための生物学的デバイスとして想定され得る（Gaoら，1999，PNAS，96：6025を参照のこと）。従って、抗体（または抗体誘導体（例えば、scFv、Fabなど））を特定の標的タンパク質の機能的に重要なドメインの検出のためのツールとして、または他方で、特定の相互作用を特異的に媒介する（すなわち、生物学的基質FXに対するFIXaの活性を活性化または増強する）アミノ酸配列を描写（*delineation*）するためのいずれにも使用され得る。後者のプロセスは、FIXa増強剤としての、多数の重鎖CDR3領域（CDR3_H）由来ペプチド配列の評価へと導いた。

【0090】

このような活性を示すペプチドの凝血原活性の増強は、FIXa活性の増強を媒介するために重要なペプチド領域における配列改変を通して達成され得る。増強された凝血原活性を有するペプチド配列への可能な工程として、FIXa分子上の抗体の結合部位（すなわち、198/A1または198/B1）を、配列比較分析、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析および競合的ELISA分析を使用することによってマッピングする。FIXの結晶構造が既知であるので、引き続いて、分子モデリングを使用して、すなわち、ヒトFIXa上の198/B1結合部位における198/B1由来ペプチドの適合を改善する。

【0091】

他方で、例えば、「アラニンスキャニング変異分析（alanine scanning mutational analysis）」によって、所定のペプチド配列（例えば、198/A1または198/B1 CDR3_H由来のペプ

チド配列)の秩序的(met h o d i c a l)変異分析によって、凝血原活性に重要なペプチド残基の同定が可能となる。特定のペプチド配列の活性を改善するための別の方法は、高スループットスクリーニングと組み合わせたペプチドライブラリーの使用である。

【0092】

抗体の抗原結合部位は、VL-HLダイマー(またはFv領域)のN末端の近位する6つの「相補的決定領域(complement determining region)(CDR)」に由来する。所定の抗原に対する抗体特異性に対する単一のCDRの寄与は、非常に多様であり得るが、一般に、重鎖のCDR3領域(CDR3_H)が特に影響する、すなわち、CDR3_H領域の特定のタンパク質配列が抗原認識に非常に重要であり得ると考えられる。CDR3_H領域の長さは、非常に多様であることが報告されており、4~25アミノ酸の範囲である(Borrebaeck、16頁)。

【0093】

ペプチド配列の系統的な変異分析の例を以下に示す。抗FIX/FIXa抗体のCD3領域由来のペプチドの可溶性/凝血促進性(procoagulant)効率を改善するために、N末端およびC末端のアミノ酸配列を変化させた。さらに、一連の変異ペプチドを構築しそして分析した。

【0094】

このような研究の原理を、抗体198/A1および198B/1のCDR3_H領域由来の一連のペプチドによって例示する。それぞれ、元のペプチドA1(表2を参照のこと)は、抗体198/A1のCDR3_H領域に由来し、そしてペプチドB1は、抗体198B/1のCDR3_H領域由来に由来する(実施例10、図16および17を参照のこと)。用語「スクランブルバージョン(scrambled version)」とは、ペプチドが、同じアミノ酸をランダムな順序で有することを意味する。

【0095】

【表2】

ペプチド	配列	アミノ酸	MW (D)	pI	注記
A1	EGGGYYVNWYFDV (配列番号 9)	(13aa)	1569	7,2	溶解性 可溶性
A1/1	VYGFGWGYEVNDY (配列番号 10)	(13aa)	1569	7,1	A1のスクランブルバージョン
A1/2	EEEEGGGGYYVNWYFDEEE (配列番号 11)	(18aa)	2244	5,8	酸性の pI, 可溶性
A1/3	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 12)	(18aa)	2407	9,9	塩基性の pI, 可溶性
A1/4	EYGEYGEVNEYDEFWE (配列番号 13)	(18aa)	2244	5,8	A1/2のスクランブルバージョン
A1/5	VRYRNRWRWGYRGRFGDE (配列番号 14)	(18aa)	2407	9,9	A1/3のスクランブルバージョン
A1/3-scr3	RRRGEYGVYWNGDFYRRR (配列番号 15)	(18aa)	2407	9,9	A1/3のスクランブルバージョン
A1/3-Rd	RdRdRdEGGGYYVNWYFDRdRdRd (配列番号 16)	(18aa)	2407	9,9	L-Arg を D-Arg に置換 したペプチド - A1/3
A1/3-Rd-srmb	RdRdRdGEYGVYWNGDFYRdRdRd (配列番号 17)	(18aa)	2407	9,9	A1/3-Rd の スクランブルバージョン

(表2)

一連の抗体198/A1由来ペプチドのリスト。ペプチドの長さ (aa, アミノ酸数)、算出した分子量 (MW、ダルトン (D)) および統計学的等電点 (pI) をリストする。D-Arg は、Rd と省略する。

【0096】

第1のシリーズの実験において、本発明者らは、元のCDR3_HペプチドのC末端Val残基を除去し、そしてN末端およびC末端にいくつかの荷電残基を付加することによって、その元のCDR3_Hペプチド配列 (A1; EGGGYYVNWYFDV) の可溶性を改善した。得られたペプチドA1/2 (酸性のpI)、A1/3 (塩基性のpI) およびこれらのそれぞれのスクランブルバージョンA1/4、A1/5およびA1/3scr3は、生理学的pHで種々の緩衝液系

において容易に可溶性であった。

【0097】

これらのペプチドのFV I I I様 (F I X a 活性化) 活性を分析するために、市販のFV I I Iアッセイに基づくアッセイ系を開発した (実施例2および4を参照のこと)。この基本的原理は、F I X aが、補因子なしで、その天然の基質FXに対する非常に限定された活性を有することである。F I X a 活性化特性を有する基質 (すなわち、FV I I IまたはFV I I I様活性を示す基質) の存在下でのみ、実質的な量のFX aが、F I X a /アクチベーター複合体を介するFXの切断によって生成される。生成されたFX aの量を、色素形成性の基質の切断によってモニターする。この改正した色素形成アッセイの原理を、2つの代表的なペプチドA1 / 3およびA1 / 5 (表2) について記載する。簡単に言うと、ペプチドストック溶液 (イミダゾール緩衝液 (I Z) (50 mM イミダゾール、100 mM NaCl、pH 7.2) 中の25 μ lのアリコート) を、マイクロタイタープレートウェルに移し、そして37℃に温めた。供給者のプロトコルに従って、色素形成性のFX a基質 (S-2222)、合成トロンビンインヒビター (I-2581)、ウシF I X aおよびウシFXを、滅菌水中で再構成し、そしてF I X a / FXを、リン脂質と混合した。これらのペプチドは、ウシF I X aとは反応しないので、(T e s tキット中のウシFXとの混合物として生じる) 2.9 nM (多くの場合では、2.3 nM) のヒトF I X a (E R L) を添加した (実施例11、図19を参照のこと)。反応あたり、50 μ lのこのリン脂質 / F I X a / FX溶液を、25 μ lのCaCl₂ (25 mM) および50 μ lの基質 / インヒビター混液と合わせた。反応を開始するために、この125 μ lのプレミックスを、マイクロタイタープレート中のペプチド溶液に添加し、37℃でインキュベートした。サンプルの405 nmおよび490 nmの吸光度を、GENESIS™ソフトウェアを使用するL a b s y s t e m s i M E S R e a d e r M F™マイクロタイタープレートリーダーにおいて、試薬ブランクに対して種々の時点で (5分~2時間) で読み取った。この実験の結果を、実施例11、図18に示す。ペプチドA1 / 3は、2.9 nMのヒトF I X aの存在下で容易に測定可能なFX a生成を誘導したが、そのスクランブルバージョ

ンA1／5は、不活性であった。さらに、酸性ペプチドA1／2およびそのスクランブルバージョンA1／4およびA1／3-scr3は、匹敵する条件下で試験した場合に、有意な色素形成活性を付与しなかった（データは示さず）。このペプチドA1／3様の親抗体198／A1が、ウシFIXaおよびFXと反応しないことを証明するために、図19に示す実験を行った。ペプチドA1／3を、2.3 nMのヒトFIXa（hFIXa）と共に（A1／3（24 μM）、+hFIXa）、または伴わずに（A1／3（24 μM）、w/o hFIXa）、上記のようにインキュベートした。コントロール実験において、本発明者らは、反応混合液に、2.3 nMのhFIXaを補充したそのままの希釈緩衝液（IZ）を添加した。図19に示されるように、反応は、ヒトFIXaの存在下でのみ生じる。

【0098】

図18は、2.9 nMのヒトFIXa（hFIXa）の存在下でのペプチドA1／3の色素形成性FVII様活性を実証する。ペプチドA1／3のスクランブルバージョンであるペプチドA1／5は、FXaの生成を生じない。図19は、ヒトFIXa（hFIXa）の存在に対する、ペプチドA1／3の色素形成性のFVII様活性の依存性を実証する。ヒトFIXaの非存在下で、ペプチドA1／3は、FXaの生成を生じない。緩衝液コントロールであるそのままのイミダゾール緩衝液をIZと示す。

【0099】

これらのペプチドをまた、FVII欠乏血漿において凝固時間を減少するその能力について分析した。aPTTベースの1段階の凝固アッセイを、本質的には、記載（実施例6を参照のこと）のように行った。凝固時間（反応が開始してから「凝固」が形成するまでの時間）を、FVII、緩衝液コントロール（IZ）またはコントロールペプチド（スクランブルバージョン）のいずれかに対して比較した。2つの異なるaPTT試薬（DAPTTINおよびPathromtin SL）を用いて行った、2つの代表的な凝固実験の結果を、表3Aおよび表3Bに示す。

【0100】

【表 3】

例 1	ペプチド濃度	w/o FIXa sec	w/o FIXa sec	平均 sec	2.2nM FIXa sec	2.2nM FIXa sec	平均 sec
IZ	0	107,7	106,8	107	93,1	94,5	94
A1/3	15 μ M	78,2	77,1	78	59,3	59,9	60
	12,5 μ M	80,2	80,6	80	60,2	58,9	60
	7,5 μ M	97,8	97,9	98	73,1	72,7	73
	2,5 μ M	105,2	104,8	105	91,1	91	91
A1/3- scr3	15 μ M	122,5	122	122	106,1	105,5	106
	12,5 μ M	116	117,6	117	103,1	104,5	104
	7,5 μ M	114,2	113,9	114	100,8	100,6	101
	2,5 μ M	107,8	107,4	108	96,3	95,2	96
例 2	ペプチド濃度	w/o FIXa sec	w/o FIXa sec	平均 (sec)	2.2nM FIXa sec	2.2nM FIXa sec	平均 (sec)
IZ	0	111	109,7	110	94,7	95,5	95
A1/3	12,5 μ M	83,6	85,5	85	56,7	56,7	57
	10 μ M	79,1	78,5	79	63,1	62,5	63
	7,5 μ M	100,1	100,5	100	71,6	73,9	73
	5 μ M	103,4	104,8	104	77	76	77
	2,5 μ M	110,1	108,9	110	88	88,8	88
	1,25 μ M	108,7	109,3	109	90,7	90,8	91

表 3 A. 2. 2 nM のヒト F I X a の存在下または非存在下 (w/o) のいずれかにおける F V I I I 欠乏血漿におけるペプチド A 1 / 3 および A 1 / 3 - s c r (A 1 / 3 のスクランブルバージョン) の凝固活性。2 つの独立した代表的な実験 (実験 1 および実験 2) を示す。全ての凝固実験を 2 連で行った。個々の実験についての凝固時間を取り、平均凝固時間を秒 (sec.) で表す。表 3 A に示す実験は、a P T T 試薬 D A P T T I N (B a x t e r H y l a n d I m m u n o) を使用して行った。緩衝液コントロール (I Z、イミダゾール緩衝液) に比べて、ペプチド A 1 / 3 は、凝固時間における用量依存性の減少を生じた。この凝固時間の減少は、この反応混合液に対する 2. 2 nM の活性化ヒト F I X の添加によってさらにより明らかとなった。ペプチド A 1 / 3 のスクランブルバージョン A 1 / 3 - s c r 3 は、凝固時間の減少を示さなかった。実際に、2. 5 μ M よりも高い濃度では、このスクランブルペプチドは、阻害性になり、

従って、凝固時間を延長した。ペプチドA1／1、A1／2、A1／4およびA1／5は、凝固時間の減少を生じず、これは、これらが、凝血促進活性を欠いていることを示す（データは示さず）。

【0101】

【表4】

	最終濃度	w/o FIXa sec	w/o FIXa sec	平均 sec	2.2nM FIXa sec	2.2nM FIXa sec	平均 sec
IZ	0	131,8	132,1	132	107,9	108,7	108
FVIII	12,5mU/ml	68,9	69	69	52,9	53,6	53
	6,25mU/ml	77,8	77,9	78	58,6	58,9	59
A1/3							
	15μM	152,8	149,3	151	75,4	75,2	75
	10μM	135,7	134,6	135	76,2	79,8	78
	5μM	152,6	155,6	154	86,6	90,2	88
	1μM	138,3	138,8	139	103,7	105,9	105

表3B. Pathromtin SL (DADE Behring) をaPTT試薬として使用する場合のFVIII欠乏血漿におけるペプチドA1／3の凝固活性。実験を、2.2nMのヒトFIXaの存在下または非存在下（w/o）のいずれかで、2連で行った。個々の実験についての凝固時間を取り、平均凝固時間を秒（sec.）で表す。第VIII因子およびイミダゾール緩衝液（IZ）を、それぞれ、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして含んだ。

【0102】

表3Aに示した実験と対照的に、表3Bに示した実験は、aPTT試薬Pathromtin SLを使用して行った。FIXaの存在下で、ペプチドA1／3は、凝固時間の用量依存性の減少を生じたが、FIXaの非存在下では、凝固時間の減少は検出されなかった。

【0103】

別のシリーズの実験において、本発明者らは、ペプチドA1／3の血漿安定性（例えば、タンパク質分解からの保護）を改善することを行った。1つのアプローチは、N末端およびC末端のL-Ar g残基のD-Ar g残基での置換である（ペプチドA1／3-r dおよびA1／3-R d-s r m bによって例示される）。次いで、ペプチドA1／3-r dおよびA1／3-R d-s r m b（このペプチドA1／3-r dのスクランブルバージョン）を、色素形成性およびa P T Tベースの凝固アッセイにおいて分析した。これらの実験は、末端L-Ar g残基のD-Ar g残基での交換が、色素形成アッセイにおいて測定されたようなF V I I I様活性を変化しないことを示し、これは、このAr g残基のキラリティーが、色素形成活性において主な役割を果たしていないことを示す（図20）。さらに、a P T Tベースの1段階の凝固活性は、幾分減少されたが、なお容易に検出可能であった（表4）。

【0104】

【表5】

	ペプチド 濃度	w/o FIXa sec	w/o FIXa, sec	平均 sec	2.2nM FIXa sec	2.2nM FIXa sec	平均 sec
I Z	0	110	109, 1	110	96	96	96
A1/3	15 μ M	77, 8	78	78	56, 1	55, 5	56
	12, 5 μ M	99, 4	100, 5	100	65	68	67
	10 μ M	104, 4	104, 5	104	72	73, 2	73
	7, 5 μ M	105, 2	105, 2	105	80, 7	80, 5	81
	5 μ M	108, 4	107, 7	108	89, 7	88, 3	89
	2, 5 μ M	107, 9	107, 6	108	93, 6	93, 3	93
	1, 25 μ M	106, 7	107	107	94, 4	95	95
A1/3- Rd	15 μ M	96, 4	95, 4	96	76, 1	74, 4	75
	12, 5 μ M	98	98, 6	98	72, 3	73, 7	73
	10 μ M	93, 5	95, 8	95	74, 2	77, 2	76
	7, 5 μ M	97, 6	98, 1	98	80, 9	82, 2	82
	5 μ M	99, 2	99, 1	99	86	85, 1	86
	2, 5 μ M	102, 7	103, 4	103	94, 4	94, 7	95
	1, 25 μ M	107, 5	107, 7	108	96, 6	96	96
A1/3- Rd srmb	15 μ M	121, 9	121, 3	122	112, 7	112, 4	113
	12, 5 μ M	117, 2	118	118	108, 1	107, 8	108
	10 μ M	115, 8	115, 3	116	107, 2	107, 8	108
	7, 5 μ M	114, 6	113, 6	114	107, 6	106, 6	107
	5 μ M	113, 1	112, 4	113	108, 5	108, 2	108
	2, 5 μ M	111, 9	111, 9	112	105	104, 2	105
	1, 25 μ M	107, 2	107, 1	107	101, 1	105, 3	103

表4 ペプチドA1/3、A1/3-RdおよびA1/3-Rd-srmb（配列は、表2を参照のこと）の1段階の凝固活性。I Z（緩衝液コントロール）。

【0105】

図20は、ペプチドA1/3-Rdの変化されない色素形成活性を実証する。12 μ Mの最終濃度のペプチドまたは緩衝液コントロール（I Z）を、2.3nMのヒトFIXa（+）の存在下でインキュベートした。ペプチドA1/3およびA1/3-Rdの色素形成活性は、実質的に変化されないことが示され、そしてこの色素形成アッセイにおいてほぼ同一の結果を生じた。A1/3のスクランブルバージョン、A1/5および緩衝液は、有意なFXa生成を生じなかった。

【0106】

次のシリーズの実験において、本発明者らは、各々の残基のアミノ酸アラニン

での置換による、このペプチドコア配列の任意のアミノ酸の個々の役割を決定することをを行った（表5）。

【0107】

【表6】

ペプチド	配列	アミノ酸数	MW (D)	pI	注記
A1/3	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 18)	(18aa))	240 7	9, 9	増粘性のPI, 取粘性
A1/3- 13	RRRAGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 19)	(18aa))	234 9	10 .4	E ₁ -A ₁
A1/3- 1	RRREAGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 20)	(18aa))	242 1	9, 9	G ₂ -A ₂
A1/3- 2	RRREGAGYYVNWYFDRRR (配列番号 21)	(18aa))	242 1	9, 9	G ₃ -A ₃
A1/3- 3	RRREGGAYVNWYFDRRR (配列番号 22)	(18aa))	242 1	9, 9	G ₄ -A ₄
A1/3- 4	RRREGGGAYVNWYFDRRR (配列番号 23)	(18aa))	231 5	9, 9	Y ₅ -A ₅
A1/3- 5	RRREGGGYAVNWYFDRRR (配列番号 24)	(18aa))	231 5	9, 9	Y ₆ -A ₆
A1/3- 6	RRREGGGYYANWYFDRRR (配列番号 25)	(18aa))	237 9	9, 9	V ₇ -A ₇
A1/3- 7	RRREGGGYYVAVWYFDRRR (配列番号 26)	(18aa))	236 4	9, 9	N ₈ -A ₈
A1/3- 8	RRREGGGYYVNAYFDRRR (配列番号 27)	(18aa))	229 2	9, 9	W ₉ -A ₉
A1/3- 9	RRREGGGYYVNWAFDRRR (配列番号 28)	(18aa))	231 5	9, 9	Y ₁₀ -A ₁₀
A1/3- 10	RRREGGGYYVNWYADRRR (配列番号 29)	(18aa))	233 1	9, 9	F ₁₁ -A ₁₁
A1/3- 11	RRREGGGYYVNWYFAARRR (配列番号 30)	(18aa))	236 3	10 .5	D ₁₂ -A ₁₂
A1/3- 12srm b	RRRYVYNGWGYFEGARRR (配列番号 31)	(18aa))	236 3	10 .4	アミノ酸 バリエーション

表5. ペプチドコア配列 (E₁G₂G₃G₄Y₅Y₆V₇N₈W₉Y₁₀F₁₁D₁₂) 内の
任意の単一のアミノ酸の役割を解明するために設計されたペプチドを列挙する。
下の枠の番号は、そのペプチド内のアミノ酸の位置を記載する。アラニン (荷電

していない小さなアミノ酸)で、各アミノ酸を置換した(「アラニンスキャン」)。ペプチドの長さ(アミノ酸数)、分子量計算値(MW(ダルトン(D)))および統計的等電点(pI)もまた列挙される。

【0108】

各ペプチドを、それぞれイミダゾール緩衝液(50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH 7.2)に溶解し、続いて凝固緩衝液(50mM イミダゾール、100mM NaCl、1% ヒトアルブミン、pH 7.4)中所望の最終濃度まで希釈した。これらのペプチドをその色素形成活性について、およびそのFVII欠損血漿における凝固時間を減少する能力について分析した。一段階凝固アッセイを本質的に記載されるように(実施例6を参照のこと)行った。凝固時間(反応の開始から「凝塊」形成までの時間)を、緩衝液コントロールまたはコントロールペプチドのいずれかに対して比較した(スクランブルバージョン)。「アラニンスキャン」のいくつかの結果をペプチドA1/3-2およびA1/3-3について示す。ペプチドA1/3-2で例示される場合のG₃-A₃の変化は、2.2nMのヒトFIXaの存在下で、高い色素形成活性および一段階凝固時間の強い減少(12.5μMの濃度で34秒)を生じる。ペプチドA1/3-3(G₄-A₄)は、より高いかまたはより低い濃度での減少した活性と共に、12μM付近の最終濃度での最適の色素形成活性を示す。このペプチドは、FIXaの非存在下でのより高い濃度(12.5μM)での一段階凝固アッセイにおいていくらか抑制性であるが、2.2nMのFIXaの存在下では強く活性になる(31秒、12.5μM)。

【0109】

次の一連の実験において、本発明者らは、各コア残基をアミノ酸であるグルタミン酸(E)で置換することにより、ペプチドコア配列の任意のアミノ酸の個々の役割を決定するように設計した(表6を参照のこと)。

【0110】

【表7】

ペプチド	配列	アミノ酸	MW (D)	pI	備考
A1/3	RRREGGGYYVNWYFDRRR	(18aa)	2407	9.9	塩基性 pI, 可溶
A1/3-22	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 32)	(18aa)	2479	9.5	G ₂ -E ₂
A1/3-23	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 33)	(18aa)	2479	9.5	G ₃ -E ₃
A1/3-24	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 34)	(18aa)	2479	9.5	G ₄ -E ₄
A1/3-26	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 35)	(18aa)	2373	9.4	Y ₅ -E ₅
A1/3-27	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 36)	(18aa)	2373	9.4	Y ₆ -E ₆
A1/3-28	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 37)	(18aa)	2437	9.5	V ₇ -E ₇
A1/3-29	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 38)	(18aa)	2422	9.5	N ₈ -E ₈
A1/3-30	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 39)	(18aa)	2350	9.5	W ₉ -E ₉
A1/3-31	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 40)	(18aa)	2373	9.4	Y ₁₀ -E ₁₀
A1/3-32	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 41)	(18aa)	2389	9.5	F ₁₁ -E ₁₁
A1/3-33	RRREGGGYYVNWYFDRRR (配列番号 42)	(18aa)	2421	9.9	D ₁₂ -E ₁₂
A1/3-34srmb	RRRGEYGEYWNWGFYRRR (配列番号 43)	(18aa)	2437	9.5	スラング バージョン

表 6. ペプチドコア配列 (E₁G₂G₃G₄Y₅Y₆V₇N₈W₉Y₁₀F₁₁D₁₂) 内の任意の単一のアミノ酸の役割を解明するために設計されたペプチドを列挙する。下の枠の番号は、そのペプチド内のアミノ酸の位置を記載する。グルタミン酸（負に荷電した大きなアミノ酸）で、このコア配列の各アミノ酸を置換した（「グルタミン酸スキャン」）。ペプチドの長さ（アミノ酸数）、分子量計算値（MW（ダルトン（D））および統計的等電点（pI）もまた列挙される。

【0111】

各ペプチドを、それぞれイミダゾール緩衝液（50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH 7.2）に溶解し、続いて凝固緩衝液（50mM イミダゾール、100mM NaCl、1% ヒトアルブミン、pH 7.4）中所望の最終濃度まで希釈した。一連の「グルタミン酸スキャン」由来のペプチド

をその色素形成FV I I I様活性について、およびそのFV I I I欠損血漿における凝固時間を減少する能力について分析した。一段階凝固アッセイを本質的に記載されるように（実施例6を参照のこと）行った。

【0112】

ペプチドA1／3-24は、いくつかの興味深い特性を示した。この分子は、高色素形成FV-I I I様活性を $6.5 \mu\text{M}$ ～ $12 \mu\text{M}$ の間の濃度で示したが、より高い濃度（ $24 \mu\text{M}$ まで）では失活した。このペプチドは、ヒトFIXaの非存在下では凝血促進活性を有していなかったが、 2.2 nM のhFIXaの存在下では強く活性であった。

【0113】

第2の一連の実験において、本発明者らは、ペプチド配列B1由来の抗体198／B1 CDR3Hの凝血促進活性を改善するように設計した。第1の工程において、本発明者らは、元のペプチド配列（B1；EGGGFTVNWYFDV）の溶解性を、C末端Val残基を除去し、そしていくつかの荷電した残基をこのペプチドのN末端およびC末端に付加することにより改善した。得られたペプチドB1／4、B1／6（酸性 pI）、B1／7（塩基性 pI）およびそのスクランブルされたバージョンB1／5、B1／7scr3は、生理学的pHにおいて種々の緩衝液系に容易に可溶である。

【0114】

【表8】

ペプチド	配列	アミノ酸数	MW (D)	pI	備考
B1	EGGGFTVNWYFDV (配列番号 44)	(13aa)	1491	6,0	減少して溶解性
B1/4	REGGGFTVNWYFDR (配列番号 45)	(14aa)	1704	7,9	可溶
B1/5	FGVGYRGETRNFWD (配列番号 46)	(14aa)	1704	8,0	スクランブルバージョン、可溶
B1/6	EEEEGGGFTVNWYFDEEE (配列番号 47)	(18aa)	2166	5,0	酸性 pI、可溶
B1/7	RRREGGGFTVNWYFDRR (配列番号 48)	(18aa)	2329	9,9	塩基性 pI、可溶
B1/7scr3	RRRFGVGYGETNFDWRRR (配列番号 49)	(18aa)	2329	9,9	塩基性 pI、可溶、スクランブルバージョン

表7は、一連の抗体198/B1誘導ペプチドのリストである。ペプチドの長さ (aa、アミノ酸数)、分子量計算値 (MW、ダルトン (D)) および静止等電点 (pI) が列挙される。

【0115】

ペプチドB1/4およびB1/5は、50mM Tris、100mM NaCl、pH=6.5に可溶であった。両方のペプチドを、色素形成FVIIIAッセイにおいて分析した。ペプチドB1/4は、いくらかの色素形成活性（データは示されず）を有することが見出されたが、スクランブルバージョンB1/5では見いだされなかった。

【0116】

続いて、ペプチドB1/6、B1/7およびB1/7scr3を分析した。各ペプチドを、それぞれ50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH 7.2に溶解し、そして続いて凝固緩衝液（50mM イミダゾール、100mM NaCl、1%ヒトアルブミン、pH 7.4）またはイミダゾール緩衝液のいずれか中に所望の最終濃度まで希釈した。これらのペプチドをその色素形成活性およびFVIIIA欠損血漿における凝固時間を減少する能力について分析した（表8および9）。一段階凝固アッセイを、本質的に記載されるとおりに（実施例6を参照のこと）行った。凝固時間（反応の開始から「凝塊」形成までの時

間)を、緩衝液コントロールまたはコントロールペプチドのいずれかに対して比較した(スクランブルバージョン)。

【0117】

ペプチドB1/7由来のFIXa活性化活性(FVII補因子様活性)を、最初に上記の色素形成アッセイにおいて測定した。

【0118】

図21に示されるように、2.4 μ MペプチドB1/7の反応混合物への添加は、十分に測定可能なFIXaの生成をもたらした。対照的に、35 μ MのPefablock Xa(FIXaプロテアーゼ活性の特異的インヒビター)の添加は、色素形成基質切断反応の有意な減少(図22)を生じ、それにより実際にペプチド-FIXa媒介FIXa生成をもたらした。FIXaおよびFXの反応混合物への添加がない場合、FIXaは合成されなかった(図22)。ペプチドB1/6およびコントロールペプチドB1/5およびB1/7scr3は、活性を示さなかった(データは示さず)。

【0119】

図21は、ペプチドB1/7の色素形成活性を実証する。最終濃度2.4 μ Mでのペプチドまたは緩衝液コントロール(IZ)を2.3 nMのヒトFIXaの存在下でインキュベートした。

【0120】

図22において、最終濃度2.4 μ MでのペプチドB1/7または緩衝液コントロール(IZ)でのペプチドを2.3 nMのヒトFIXaの存在下でインキュベートした(「+2.3 nM hFIXa」、または「+」のいずれかとして示される)。ペプチドB1/7の色素形成活性は、FIXaおよびFXの存在に依存することが見出された。なぜならば、FIXaおよびFXが反応から離される場合(w/o FIXa/FX)、反応が全く検出できないからである。ペプチドB1/7が実際にFIXa生成を媒介することを立証するために、FIXa特異的プロテアーゼインヒビターPefablock Xaを反応混合物に添加した(35 μ M Pefablock Xa)。第2の一連の実験において、ペプチドB1/6、B1/7およびB1/7scr3の凝血促進効果を、aPTTベースの1

工程凝固アッセイにおいて試験した。これらの実験を本質的に実施例6に記載の通りに行った。結果を表8および9に示す。

【0121】

【表9】

ペプチド	12,5 μ M (-)	1.25 μ M (-)	0.125 μ M (-)	12,5nM (-)	緩衝液 (-)	備考
B1/6	115	110	111	111	110	
B1/7	157	112	109	110	110	
B1/7scr3	115	105	106	105	107	

表8：FV I I I 欠損血漿を、ペプチドB1/6、B1/7scr3またはB1/7のいずれかと共に活性化ヒトF I Xの非存在下でインキュベートした。ネガティブコントロールとして、純粋な緩衝液を欠損血漿に添加した。種々の組合せについての凝固時間を示す。これらの条件下で、その最高濃度（12.5 μ M）におけるペプチドB1/7は、157秒という延長した凝固時間により示されるように、凝固プロセスに対して抑制性になる。

【0122】

【表10】

ペプチド	12,5 μ M (+)	1.25 μ M (+)	0.125 μ M (+)	12,5nM (+)	緩衝液 (+)	備考
B1/6	103	100	101	100	100	
B1/7	83	92	99	99	100	
B1/7scr3	102	94	94	94	94	

表9：FV I I I 欠損血漿を、ペプチドB1/6、B1/7scr3またはB1/7のいずれかと共に、活性化ヒトF I Xの存在下でインキュベートした。凝固時間を種々の組合せについて示す。F I X aの存在下において、ペプチドB1/7は、減少した凝固時間（スクランブルペプチドについて102秒、および緩衝液コントロールについて100秒と比較して83秒）により示されるように凝血促進性になる。

【0123】

(実施例12：FV I I I インヒビター血漿における抗F I X / F I X a 抗体のCDR3領域から得られるペプチド誘導体の凝血促進活性)

FV I I I インヒビター血漿におけるペプチドA1 / 3の凝血促進活性についてアッセイするために、以下の実験を実行した。本発明者らは、一段階凝固アッセイをベースとする標準a PTTを行ったが、FV I I I 欠損血漿の代わりに、本発明者らはFV I I I インヒビター血漿を採用した。血漿の阻害性能力は、1 mlあたり8.1 Bethesda ユニットであった。

【0124】

【表11】

		w/o FIXa	w/o FIXa			FIXa	FIXa	
	ペプチド 濃度	秒	秒	平均 秒		秒	秒	平均 秒
I Z	0	104,8	103,6	104		94,2	94,1	94
A1/3	12,5 μ M	85,8	85,3	86		61	60,2	61
	10 μ M	88,4	87,9	88		61,3	61,8	62
	7,5 μ M	93,7	92,7	93		68,8	70,9	70
	5 μ M	101,5	101,1	101		81	82	82
	2,5 μ M	106,1	105,3	106		90,2	90,5	90
	1,25 μ M	104,5	104,3	104		91,3	91,4	91

表10：種々の量のペプチドA1 / 3 (12.5 μ M~1.25 μ M) をFV I I I インヒビター血漿に (2.2 nMのF I X aの存在下 (F I X a) または非存在下 (w/o F I X a) のいずれかで) 添加した。ネガティブコントロールとして、純粋な緩衝液を血漿に添加した (I Z)。実験を2回行い、そして平均 (a v e r .) を算出した。凝固時間 (秒) を種々の組合せについて示す。ペプチドA1 / 3が、(用量依存性の様式で) FV I I I インヒビター血漿の凝固時間を、F I X aの存在下で、たとえ非常に少ない程度でも、またF I X aの非存在下でも減少させることは容易に理解できる。

【0125】

(実施例13：196 / C4 I g MのI g G 1への変換)

いくつかのIgM抗体は高FV I I I様活性を色素形成アッセイにおいて示すので、このようなIgM抗体をIgG抗体に(Fab、F(ab)2、scFvなどのような抗体誘導体もまた産生され得るが)変換させようと試みた。IgM可変領域遺伝子のレスキューが以下に詳細に記載される。発現ベクターpBax-IgG1(図23)を、ベクターpSI(Promega)およびpEF/Bsd(Invitrogen)から複数のクローニング工程を介して最初に構築した。ドナーのBリンパ球を血液から精製し、そして成熟mRNAを「micro-mRNA purification-kit」(Pharmacia)を使用してこれらの細胞から精製した。ヒトκ鎖およびヒトγ1鎖のcDNAを、「you-prime first-strand-cDNA-kit」(Pharmacia)を採用して特異的プライマーを使用して調製した。

【0126】

ヒトκ軽鎖定常ドメインのコード配列を、PCRにより特異的プライマーを使用してcDNAから増幅する。

【0127】

ヒトγ1鎖定常領域(CH1-ヒンジ-CH2-CH3)の遺伝子を、PCRにより特異的プライマーを使用して増幅する。

【0128】

軽鎖定常ドメインの軽鎖のPCR産物を、XbaIおよびNheIを用いて消化し、そして消化されたpSI中に挿入した。得られたベクターをEcoRIおよびXbaIを用いて切断し、そしてアニーリングされたオリゴヌクレオチドを挿入し、ベクターpSI-Cκを生じた。アニーリングされたオリゴヌクレオチドは、κ鎖可変領域挿入のためのリーダー部位およびSacI-XbaI部位を提供する。ヒトγ1鎖定常領域のPCR産物を、SpeIおよびBamHIを用いて消化し、そして消化されたpSIに挿入する。得られたベクターをSpeIおよびNotIで切断し、そしてアニーリングされたオリゴヌクレオチドを挿入して、ベクターpSI-Cγを生じる。アニーリングされたオリゴヌクレオチドは、重鎖可変領域の挿入のためのリーダー部位およびXhoI-BstE I部位を提供する。ベクターpEF/BsdをNheIおよびSfiIで消化し、Kl

enow処理により平滑末端にし、そしてpS I-C κ 全体の発現カセット（Bgl I I IおよびBamH Iを用いて切除される）を（Klenow処理の後に）挿入する。得られたベクターをEcoR IおよびHind I I Iを用いて消化し、そしてKlenow処理する。pS I-C γ の全体の発現カセットをBgl I I IおよびBamH Iで切除し、そして挿入する（Klenow処理後）。得られたベクターをpBax-IgG Iと称する。

【0129】

軽鎖可変領域をSac I-Xba I部位の間に挿入し得、 κ 軽鎖の完全コード配列を得る。重鎖可変領域を、Xho I-Bst E I I部位の間にクローニングし得、完全IgG I重鎖遺伝子を生じる。両方のオープンリーディングフレームは、SV40プロモーターの制御下で発現され、シグナルペプチドのコード配列を、遺伝子の5'末端において小胞体への重鎖および軽鎖の分泌のために含む。COS細胞へのトランスフェクションは、親IgMと同じ結合特性を有するIgG Iの発現を可能にする。プラスミドpBax-196/C4の構築は、特異的プライマーを使用するPCRにより196/C4 scFvのVH（実験10において記載されるようにサブクローニングされる）を増幅することによりさらに達成され得る。PCR産物を、Xho IおよびBst E I Iを用いて消化し、そしてXho IおよびBst E I I消化pBax-IgG Iに挿入する。196/C4 scFvのVLを、特異的プライマーを使用するPCRにより増幅する。PCR産物をSac IおよびXba Iを用いて消化し、そしてSac IおよびXba I消化pBax-IgG I-VHに挿入する。得られたベクター（pBax-196/C4）をエレクトロポレーションによりCOS細胞にトランスフェクトし、そして親IgMと同じ特異性を有するハイブリッドIgG I分子（マウス可変領域およびヒト定常領域）が発現される。

【0130】

（実施例14：抗FIXa抗体によるFIXaアミド分解活性の活性化：）

手短に言うと、20 μ lの第IXa因子（200mUのFIXa（Stago）を含む）を、200 μ lの反応緩衝液（50mM TrisHCl pH7.4, 100mM NaCl, 5mM CaCl₂および40%エチレングリコー

ル)、 $25\mu\text{l}$ のFIXa基質($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-D-CHG-Gly-Arg-pNA}$, AcOH , $10\mu\text{M}/\text{ml}$, Pentapharm LTD)と共に、種々の量の抗FIX抗体198/B1(IgGアイソタイプ)または196/AF1(IgMアイソタイプ)の存在下または非存在下で、 37°C でインキュベートした。FIXa基質の特異的切断を、ELISAリーダーにおいて 405nm でモニターした。抗FIX抗体の存在は、FIXaのアミド分解活性を少なくとも2倍増大した。図24は、抗体198/B1(図24A)および抗体198/AF1(図24B)の存在下でのFIXaのアミド分解活性の増加を示す。

【0131】

(実施例15:抗FIX/FIXa-抗体由来のFabフラグメントによって示されるFVII様活性)

抗FIX/FIXa抗体のFabフラグメントを、標準的プロトコルに従って調製し、そして精製した。手短に言うと、 1ml の抗体198/A1(50mM のイミダゾール中に $4\text{mg}/\text{ml}$, 100mM NaCl , $\text{pH}7.4$)を、 $87\mu\text{l}$ の細分緩衝液(1M Naアセテート , 10mM EDTA $67.5\text{mg}/\text{ml}$ L-ヒスチジン)および 0.25mg のパパイン(アガロースビーズ上に固定化)と共に一晩 37°C でインキュベートした。この調製物を濾過してパパインを除去した。 L-ヒスチジン を添加し(最終濃度 50mM)、そしてその後 pH を 7.0 に調製した。最後に、固体の NaCl を添加して、 1M の最終濃度を得た。引き続いて、198/A1 Fabフラグメントを、プロテインLに結合させることによって精製した:本発明者らは、PHARMACIA XK16/20カラム(ゲル容量: 2ml)中のImmunoPure Immobilized PROTEIN L Plus(Pierce)を使用し、クロマトグラフィーのための緩衝液は以下のものであった:1)平衡緩衝液: 50mM L-ヒスチジン $\text{pH}7.0$; 1M NaCl ; 0.1% (w/v) NaN_3 ; 2)洗浄緩衝液: 50mM L-ヒスチジン $\text{pH}7.0$; 0.1% (w/v) NaN_3 ; 3)溶出緩衝液: 100mM グリシン $\text{pH}2.5$; 0.1% (w/v) NaN_3 ; および4)中和緩衝液: 2M Tris/Cl $\text{pH}8.0$;

クロマトグラフィーは、本質的に表 1 1 に記載される以下の工程 1 ～ 7 によって行った。溶出緩衝液の低い pH を中和するために、「画分チューブ (Fraction-tube)」を、0. 2 ml 2 M Tris pH 8. 0 と共に予めロードした。

【0 1 3 2】

【表 1 2】

	工程	緩衝液	流速	容量	C V	画分
1.	カラム洗浄	溶出緩衝液	2. 0 ml / 分	10 ml	5	廃棄
2.	平衡化	平衡緩衝液	2. 0 ml / 分	10 ml	5	廃棄
3.	サンプルロード	サンプル	1. 0 ml / 分	x ml	x	貫流
4.	洗浄 1	平衡緩衝液	1. 0 ml / 分	20 ml	10	貫流
5.	洗浄 2	洗浄緩衝液	1. 0 ml / 分	10 ml	5	貫流
6.	溶出	溶出緩衝液	1. 0 ml / 分	15 ml	7. 5	1. 0 ml 画分
7.	中和	洗浄緩衝液	2. 0 ml / 分	10 ml	5	廃棄

表 1 1

最後の 1 9 8 / A 1 Fab 調製物を、5 0 mM イミダゾール、1 0 0 mM NaCl、pH 7. 4 に対して透析し、そして上記のような色素形成 (chromogenic) F V I I I アッセイにおいて分析した (図 2 5)。インタクトな抗体と比較して、この 1 9 8 / A 1 Fab フラグメントはある程度低い活性を有していたが；この Fab フラグメントは依然として F I X 依存性 F X a 産生を生じた。図 2 5 は、2. 3 nM のヒト F I X a の存在下での抗体 1 9 8 / A 1

Fab フラグメントの色素形成 F V I I I 様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らはインタクトな抗体 1 9 8 / A 1 ならびに 7. 5 p M の F V I I I を使用した。1 9 8 / A 1 Fab フラグメントまたは F V I I I の代わりに、緩衝液コントロール (I Z) をネガティブコントロールとして使用した。

【0133】

(実施例16:抗FIX/FIXa抗体のおよびE. coliアルカリホスファターゼのscFvフラグメント間の融合タンパク質によって示されるFVII様活性)

抗体198/B1(サブクローンAB2)の単鎖Fvフラグメント(実施例10を参照のこと)を、pDAP2ベクター系を用いてE. coliアルカリホスファターゼのN末端に融合した(Kerschbaumerら、1996)。2つの同一のクローンを単離し、そしてpDAP2-198AB2#1およびpDAP2-198AB2#100と名付けた(図26)。得られた融合タンパク質をE. coli中で発現し、金属親和性クロマトグラフィー(Kerschbaumerら、1997)によって精製し、そして標準的な色素形成アッセイにおいて分析した(図27)。図27は、2.3nMのヒトFIXaの存在下での2つの抗体198/B1(サブクローンAB2)scFvフラグメント-アルカリホスファターゼ融合タンパク質(198AB2#1および198AB2#100)の色素形成FVII様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らは7.5pM FVIIを使用した。

【0134】

(実施例17:二価のミニ抗体によって示されるFVII様活性)

二価のミニ抗体を得るために、抗体198/B1(サブクローンAB2)のscFvフラグメントを、pZip1ベクター系を用いて両親媒性らせん構造に融合した(Kerschbaumerら(Analytical Biochemistry 249, 219-227, 1997))。手短に言うと、198/B1 scFvフラグメントの遺伝子を、SfiIおよびNotIでの消化によってプラスミドpDAP-198AB2#100(実施例16)から単離した。このDNAフラグメントをゲル精製し、そしてSfiI/NotI消化ベクターpZip1に挿入した。得られたプラスミドを配列決定し、そしてpZip-198AB2#102と名付けた(図28)。並行して、本発明者らは、#8860と呼ばれる無関係のモノクローナル抗体からミニ抗体の異形を構築した。最初の段階において、抗体#8860の単鎖Fvフラグメントを、ベクターpDAP

2内に構築した。このクローニングを、本質的には実施例10に記載されるように行った。この構築物をpDAP2-8860scFv#11と名付けた(図29)。pDAP2-8860scFv#11に含まれるscFvフラグメントの、プラスミドpZip1(上記を参照のこと)へのサブクローニングは、ミニ抗体構築物p8860-Zip#1.2を生じた(図30)。抗体#8860はFIX/FIXaとは反応しないので(ウエスタンブロットおよびELISA分析により判断)、これは適切なネガティブコントロールを表す。その後、このミニ抗体タンパク質をE. coliにおいて発現させ、そして以下のプロトコルに従うプロテインLへの結合によって細菌の上清から精製した:

アフィニティークロマトグラフィーについて、本発明者らは、4mlのゲル容量を有するPHARMACIA XK 16/20カラムにおいて、ImmunoPure Immobilized PROTEIN L Plus (Pierce)を使用した。使用した緩衝液は以下のものであった: 1) 平衡緩衝液: 50mM L-ヒスチジン pH7.0, 1M NaCl, 0.1% (w/v) NaN₃; 洗浄緩衝液: 50mM L-ヒスチジン pH7.0, 0.1% (w/v) NaN₃; 溶出緩衝液: 100mMグリシン pH2.5, 0.1% (w/v) NaN₃; および中和緩衝液: 2M Tris/Cl pH8.0。

【0135】

サンプルを以下のように調製した: 細菌培養物の上清を、細菌発現培養物の遠心分離(11,000×g、4℃、10分)によって得た。470gの硫酸アンモニウムを1リットルの上清に加え、そしてこの溶液を氷上で1時間攪拌してタンパク質を沈殿させた。この沈殿を、2℃、14,000×gの35分間によってペレット化し、そして100mlの20mM Tris pH7.0に再溶解させた。その後、この濃縮物を20mMのTris pH7.0に対して透析し、50mMの最終濃度までL-ヒスチジンを添加し、そしてpHを7.0に調節した。最後に、固体のNaClを添加し、1Mの最終濃度を得た。カラムにロードする前に、サンプルをまず室温、16,000×gで15分間遠心分離し、次いで0.45μmの滅菌フィルタを通して濾過した。

【0136】

クロマトグラフィーを、表12に記載される以下の工程1～7によって本質的に行った。溶出緩衝液の低いpHを中和するために、「画分チューブ (Fraction-tube)」を、0.2ml 2M Tris pH8.0と共に予めロードした。

【0137】

【表13】

	工程	緩衝液	流速	容量	CV	画分
1.	カラム洗浄	溶出緩衝液	2.0ml/分	20ml	5	廃棄
2.	平衡化	平衡緩衝液	2.0ml/分	20ml	5	廃棄
3.	サンプルロード	サンプル	1.0ml/分	x ml	x	貫流
4.	洗浄1	平衡緩衝液	1.0ml/分	40ml	10	貫流
5.	洗浄2	洗浄緩衝液	1.0ml/分	20ml	5	貫流
6.	溶出	溶出緩衝液	1.0ml/分	30ml	7.5	1.0ml画分
7.	中和	洗浄緩衝液	2.0ml/分	20ml	5	廃棄

表12。最後の198/B1 (サブクローンAB2) ミニ抗体調製物 (198 AB-Zip #102と名付けた) およびネガティブコントロールの8860-Zip #1.2を、50mMイミダゾール、100mM NaCl、pH7.4に対して透析し、そして上記のように色素形成FVIIIAッセイにおいて分析した (図31)。

【0138】

図31に見られ得るように、ミニ抗体構築物198AB-Zip #102は、実質的なFXa産生を生じたが (FVIIIAと比較して)、一方、ネガティブコントロールミニ抗体8860-Zip #1.2は生じなかった。図31は、2.3nMのヒトFIXaの存在下での、198/B1 (サブクローンAB2) ミニ抗体198AB-Zip #102の色素形成FVIIIA様活性を実証する。ポジ

ティブコントロールとして、本発明者らは4.8 pMのFV I I Iを使用し、一方、無関係のミニ抗体(8860-Zip#1.2)および単純反応緩衝液(plain reaction buffer)(IZ)はネガティブコントロールとして役立った。

【0139】

(実施例18:抗FIXa/FIX抗体scFvフラグメントによって示されるFV I I I様活性)

抗体198/B1(サブクローンAB2)の単鎖Fvフラグメントならびに抗体#8860のscFvフラグメントを、pMycHis6ベクター系を用いて発現させた。ベクターpMycHis6(図32&33)を、ベクターpCOC K(Engelhardtら,1994,Biotechniques,17:44-46)をNot IおよびEcoRIで切断し、そして以下のオリゴヌクレオチドの挿入によって構築した:mychis6-co:5'ggccgcag aacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggcggcacatcaccatcaccatcactaataag3'(配列番号79)およびmycchis-ic:5'aattctttattagtgatgggtgatgggtgatgtgccgccccattcagatccctctcttgagatgagtttttgttcttgc3'(配列番号80)。図32は、プラスミドpMycHis6の略図を示す。c-mycタグ配列は、ELISAまたはウエスタンブロット分析においてscFvフラグメントを検出するために使用される(Evanら,Mol. Cell. Biol.,1985,5(12),pp.3610-6)。His6タグ配列は、金属イオンクロマトグラフィーによるscFvフラグメントの精製を容易にするために含まれる(Hochuliら,1988,Biotechnology,6:1321-1325)。このプラスミドは、lacZ遺伝子プロモーター(PlacZ)、PelB-リーダー配列(図26の説明文を参照のこと)、E.coli複製起源(colE1ori)およびM13ファージ複製起源(M13ori)を含む。特異的選択を可能にするために、このプラスミドはまた、抗生物質アンピシリンに対する耐性を媒介する酵素β-ラクタマーゼのための遺伝子(AmpR)を保有す

る。198/B1 (クローンAB2) - scFv の遺伝子を、SfiI および NotI で消化して、そして SfiI/NotI 切断された pMycHis6 に挿入することによって、プラスミド pDAP2-198AB2#100 (実施例16) からレスキューした。得られたプラスミドを pMycHis-198AB2#102 と名付けた。図34は、198AB2 scFv のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列 (c-myc-タグおよび His6-タグに連結した) を示す: 発現ベクターの得られた ORF を、pMycHis6-198AB2#102 と名付けた。ベクター pMycHis6 を、ベクター pCOCK (Engelhardt O. ら, BioTechniques 17, 44-46, 1994) NotI-EcoRI を切断し、そして以下のアニールされたオリゴヌクレオチドを挿入することによって構築した: (5' -GGCCGCAGAACAAA AACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCGGCAC ATCACCATCACCATCACTAATAAG-3' (配列番号103) および 5' -TTATTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCCGCC CATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC TGC-3' (配列番号104))。得られたベクター (pMycHis6 と名付けた) は切断された SfiI-NotI であり、そして scFv 198AB2 の遺伝子を、ベクター pDAP2-198AB2#100 からこのベクターに交換した。198AB2 構築物に対する類似性において、#8860 scFv フラグメントを、pDAP2-8860 scFv クローン11 と名付けたプラスミドからクローンした。#8860 の純粋な scFv タンパク質を、8860-M/H#4c と名付けた (プラスミド p8860-M/H#4c、図35)。scFv タンパク質を E. coli 中で発現させ、そしてプロテインLカラム上の細菌の上清から親和性精製した (実施例17を参照のこと)。最後の MycHis-198AB2#102 および 8860-M/H#4c 調製物を、50mM イミダゾール、100mM NaCl、pH7.4 に対して透析し、そして上記のように色素形成 FVIIIAッセイにおいて分析した (図36)。

【0140】

図36において見られ得るように、scFv 構築物 MycHis-198AB

2#102は、実質的なFXaの産生を生じるが、一方、ネガティブコントロール8860-M/H#4cおよび単純反応緩衝液(IZ)は生じない。図36は、2.3nMのヒトFIXaの存在下での、198/B1(サブクローンAB2)scFvフラグメント(My cHis-198AB2#102)の色素形成FVII様活性を実証する。ポジティブコントロールとして、本発明者らは4.8pMのFVIIを使用し、一方、無関係のscFv(8860-M/H#4c)および単純反応緩衝液(IZ)はネガティブコントロールとして役立った。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、FVII様活性についての、ハイブリドーマ細胞培養からの上清のスクリーニングの結果を示す。融合実験から予め選択されたクローン(#193、#195および#196)を、色素形成アッセイで試験した。

【図2】

図2は、マスタープレートでのハイブリドーマ細胞培養における上清のIgG媒介第VII因子様活性についてのスクリーニングの結果を示す。

【図3】

図3は、クローン193/C0のサブクローニング、すなわち、一回目のクローニングの結果を示す。

【図4】

図4は、開始クローン193/C0由来のハイブリドーマ培養物の色素形成FVII様活性および第IX因子-ELISA反応性の比較を示す。

【図5】

図5は、いくつかのマスタークローンおよびサブクローンの色素形成活性の測定結果を示す。

【図6A】

図6Aは、ヒトFVII、TBS緩衝液および細胞培養培地と比較した、抗FIX/FIXa抗体193/AD3および196/AF2のFVII様活性を示す。遅滞期の後に、両方の抗体は、増加する光学密度によって判断されるように、色素形成基質の切断を生じた。

【図6B】

図6Bは、第V I I I因子、196/AF1、198/AC1/1およびマウスIgGの色素形成活性の比較を示す。

【図7A】

図7Aは、第Xa因子特異的インヒビターの添加を伴った、または伴わない、第V I I I因子および196/AF2による第Xa因子の生成の速度論の比較を示す。

【図7B】

図7Bは、第Xa因子特異的インヒビターであるPefabloc Xa（登録商標）の添加を伴った、または伴わない、第V I I I因子、マウスIgG、および抗第IX/IXa因子抗体198/AM1による第Xa因子の生成の速度論の比較を示す。

【図8A】

図8Aは、リン脂質、F I X a/FXおよびカルシウムイオンの存在下、および非存在下における、精製された抗第IX/IXa因子抗体198/AC1/1の第V I I I因子様活性の依存性の測定を示す。

【図8B】

図8Bは、リン脂質、Ca²⁺およびF I X a/FXの存在下における、抗F I X a抗体196/AF1によるFXa生成の依存性の測定を示す。

【図8C】

図8Cは、非特異的マウスIgG抗体によるFXaの生成を示す。

【図9】

図9は、種々の濃度の抗第IX/IXa因子抗体193/AD3を用いることによるAPTTアッセイにおける第V I I I因子欠乏血漿の凝固時間のグラフ表示である。

【図10A】

図10Aは、因子IXaの存在下において、抗体193/AD3が、第V I I I因子欠乏血漿の凝固時間を短縮することを示す。

【図10B】

図10Bは、第IXa因子インヒビターおよび第VII因子インヒビターの存在下における、抗体193/AD3による凝固時間の、用量依存性短縮を示す。

【図11】

図11は、ヒトFIXaβの存在下、および非存在下における、抗体198/A1、198/B1および198/AP1の色素形成活性を示す。

【図12】

図12は、マウス抗体の可変重鎖の遺伝子増幅のためのプライマー配列を示す。

【図13】

図13は、マウス抗体の可変軽(κ)鎖の遺伝子増幅のためのプライマー配列を示す。

【図14】

図14は、ハイブリドーマ細胞株193/AD3由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質の配列を示す(配列番号81および配列番号82)。

【図15】

図15は、ハイブリドーマ細胞株193/K2由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質配列を示す(配列番号83および配列番号84)。

【図16】

図16は、ハイブリドーマ細胞株198/AB2(198/B1のサブクローン)由来のscFvのDNAおよび誘導タンパク質配列を示す(配列番号85および配列番号86)。

【図17】

図17は、細胞株198/A1由来のscFvのDNAおよび推論されるタンパク質配列を示す(配列番号87および配列番号88)。

【図18】

図18は、2.9nMのヒトFIXaの存在下における、ペプチドA1/3の色素形成FVII様活性を示す。ペプチドA1/3のスクランブルバージョンペプチドA1/5は、いずれのFXa生成も起こさない。

【図19】

図19は、ヒトFIXaの存在に対する、ペプチドA1/3の色素形成FVII様活性の依存性を示す。ヒトFIXaの非存在下において、ペプチドA1/3は、いずれのFXaの生成も起こさない。緩衝液コントロールである単体のイミダゾール緩衝液は、IZと表される。

【図20】

図20は、Arg残基のキラリティーが、ペプチドA1/3-rdおよびA1/3-Rd-srmbの色素形成活性に対して有意な役割を果たさないことを示す。

【図21】

図21は、反応混合物への2.4 μMのペプチドB1/7の添加が、FXaの測定可能な生成を引き起こしたことを示す。

【図22】

図22は、FX特異的インヒビターの添加が、反応に有意な減少を引き起こすことを示す。FIXaが全く存在せず、かつFXが反応混合物に添加される場合、FXaは合成されなかった。

【図23】

図23は、ベクターpBax-IgG1を示す。

【図24】

図24は、抗体198/B1 (図24A) およびIgM抗体198/AF1 (図24B) の存在下における、FIXaのアミド分解活性の増加を示す。

【図25】

図25は、2.3 nMのヒトFIXaの存在下における抗体198/A1 Fabフラグメントの色素形成FVII様活性を示す。ポジティブコントロールとして、インタクトな抗体198/A1および7.5 pMのFVIIを使用した。緩衝液コントロール (IZ) を、ネガティブコントロールとして用いた。

【図26】

図26は、198AB2 scFv-アルカリホスファターゼ融合タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す (発現ベクターpDAP2-19

8AB2#100のORF、(配列番号89および配列番号90)。抗体198/AB2(198/AB2は、198/B1の同一サブクローンである)のVLおよびVHドメインに対する遺伝子は、実施例10に記載されるように、対応するハイブリドーマ細胞に由来した。VH遺伝子のPCR産物は、消化SfiI-AscIであり、そしてVL遺伝子のPCR産物は消化AscIおよびNotIであった。VH遺伝子およびVL遺伝子は、AscI部位を介して結合し、SfiI-NotI消化ベクターpDAP2に挿入された(Kerschbaumer R. J. ら、Immunotechnology 2、145-150、1996; GeneBank 受託番号: U35316)。PelBリーダー: Erwinia carotovoraペクテトリアーゼBのリーダー配列、Hisタグ、金属イオンクロマトグラフィーのためのヒスチジン(Histidine)タグ。

【図27】

図27は、2.3nMのヒトFIXaの存在下における、2つの抗体198/B1(サブクローンAB2) scFvフラグメントアルカリホスファターゼ融合タンパク質(198AB2#1および198AB2#100)の色素形成FVIIII様活性を示す。ポジティブコントロールとして、7.5pMのFVIIIIを使用した。

【図28】

図28は、pZip198AB2#102のアミノ酸およびヌクレオチド配列を示す(配列番号91および配列番号92)。

【図29】

図29は、mAB#8860 scFvアルカリホスファターゼ融合タンパク質(ベクターpDAP2-8860 scFv#11)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号93および94)。抗体#8860のVLドメインおよびVHドメインに対する遺伝子は、実施例10に記載されるように、対応するハイブリドーマ細胞から誘導された。VH遺伝子のPCR産物は、消化SfiI-AscIであり、そしてVL遺伝子のPCR産物は、消化AscIおよびNotIであった。VH遺伝子およびVL遺伝子は、AscI部位を介して結合し

、そしてSfiI-NotI消化ベクターpDAP2に挿入された(Kerschbaumer R. J. ら、Immunotechnology 2、145-150、1996; GeneBank 受託番号:U35316)。

【図30】

図30は、mAB#8860 scFv-ロイシンジッパー融合タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(ミニ抗体(miniantibody); ベクターp8860-Zip#1.2(配列番号95および配列番号96)。scFvフラグメントの遺伝子は、mAB#8860から誘導され、そしてベクターpDAP2-8860scFv#11からSfiI-NotI消化プラスミドpZip1へスワップされた(Kerschbaumer R. J. ら、Analytical Biochemistry 249、219-227、1997; GeneBank 受託番号:U94951)。

【図31】

図31は、2.3nMのヒトFIXaの存在下における、198/B1(サブクローンAB2)ミニ抗体198AB-Zip#102のの色素形成FVII様活性を示す。ポジティブコントロールとして、4.8pMのFVIIが用いられ、一方、ネガティブコントロールとして、無関係のミニ抗体(8860-Zip#1.2)および単体反応緩衝液(IZ)が利用された。

【図32】

図32は、プラスミドpMycHis6の概略図を示す。

【図33】

図33は、ベクターpCOCKと異なるプラスミドpMycHis6の一部分のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(配列番号97および配列番号98)。ベクターpMycHis6は、NotIおよびEcoRIによって、ベクターpCOCK(Engelhardtら、1994、Biotechniques、17:44-46)を切断し、そしてオリゴヌクレオチド:mychis6-co:5' ggccgcagaaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatggggcggcacatcacatcacatcactaataag3'(配列番号79)およびmycchis-ic:5'a

a t t c t t a t t a g t g a t g g t g a t g g t g a t g t g c c g c c c
c a t t c a g a t c c t c t t c t g a g a t g a g t t t t t g t t c t g
c (配列番号80)を挿入することによって構築された。

【図34】

図34は、(c-myc-タグおよびHis6-タグに結合した)198AB2-scFv:発現ベクターpMycHis6-198AB2#102のORFのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。ベクターpMycHis6は、ベクターpCOCK (Engelhardt O. ら、BioTechniques 17、44-46、1994)をNotI-EcoRIで切断し、そして以下のアニーリングしたオリゴヌクレオチド: (5'-GGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCGGCACATCACCATCACCATCACTAATAAG-3' (配列番号103)、および5'-TTATTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCCGCCCCCATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCTGC-3' (配列番号104))を挿入することによって構築された。その結果得られたベクター(pMycHis6と命名される)は、切断されたSfiI-NotIであり、そしてscFv198AB2の遺伝子は、このベクターへ、pDAP2-198AB2#100ベクターからスワップされた。

【図35】

図35は、c-myc-タグおよびHis6-タグに結合したmAB#8860-scFvのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す(ベクターp8860-M/H#4c、配列番号101および配列番号102)。プラスミドpMycHis6は、SfiIおよびNotIによって切断され、そしてscFv8860#11タンパク質をコードするDNA配列は、pDAP2-8860-scFv#11(図29を参照)から挿入され、プラスミドp8860-M/H#4を与えた。

【図36】

図36は、2.3nMのヒトFIXaの存在下における、198/B1(サブクローンAB2)-scFvフラグメント(MycHis-198AB2#102

) の色素形成 F V I I I 様活性を示す。ポジティブコントロールとして、4.8 pM の F V I I I を使用し、一方、ネガティブコントロールとして、無関係の s c F v (8860-M/H#4c) および単体の反応緩衝液 (I Z) が利用された。

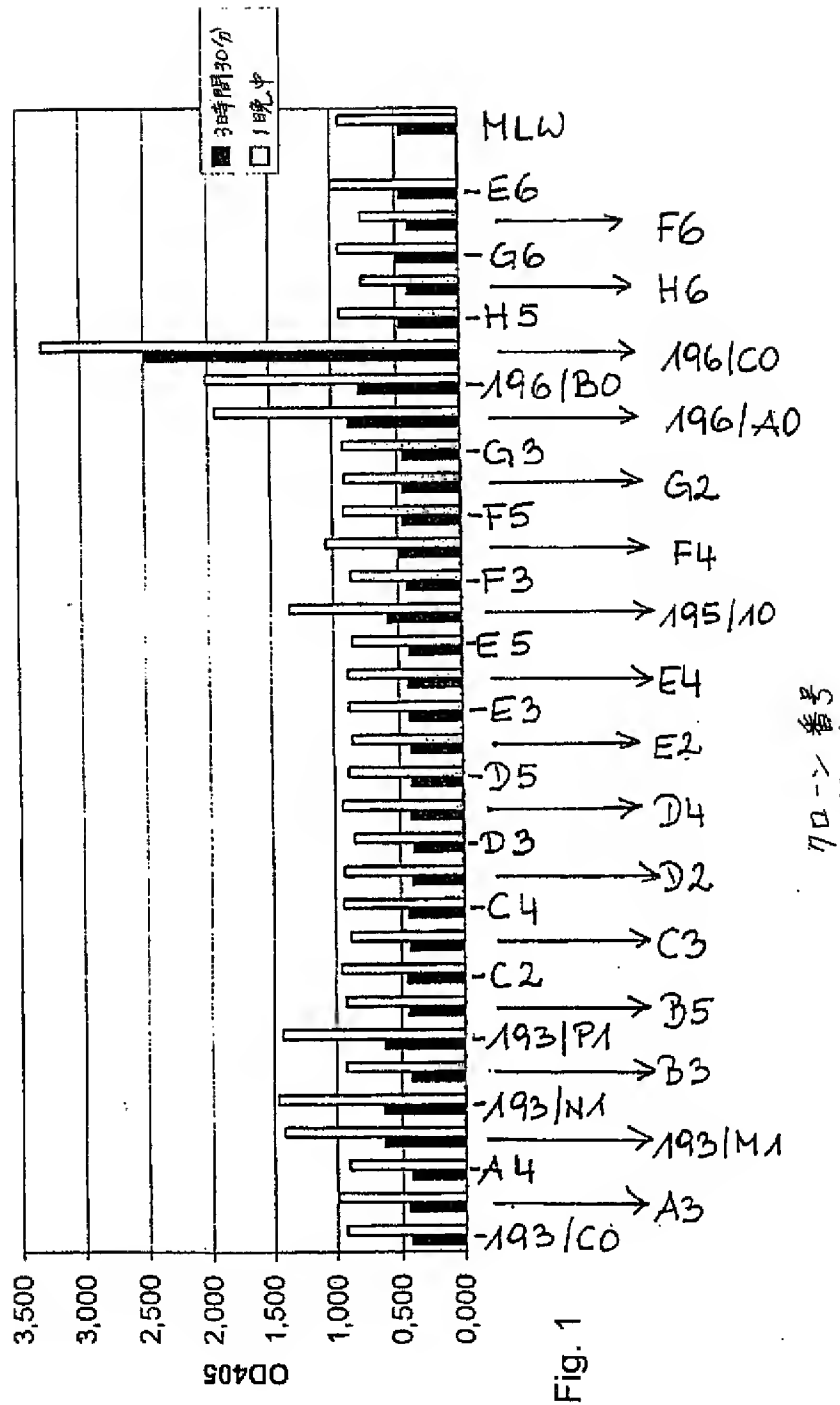
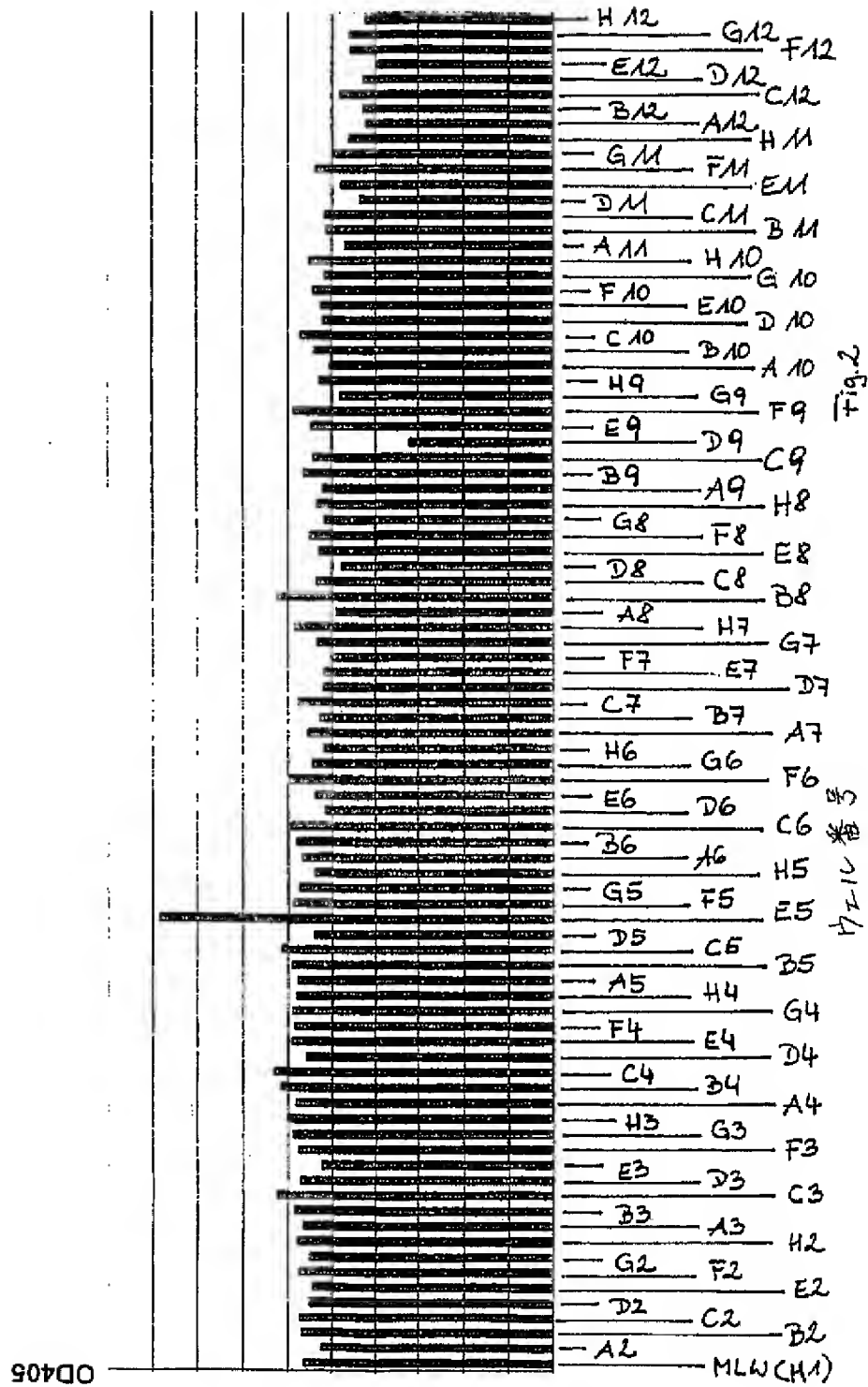
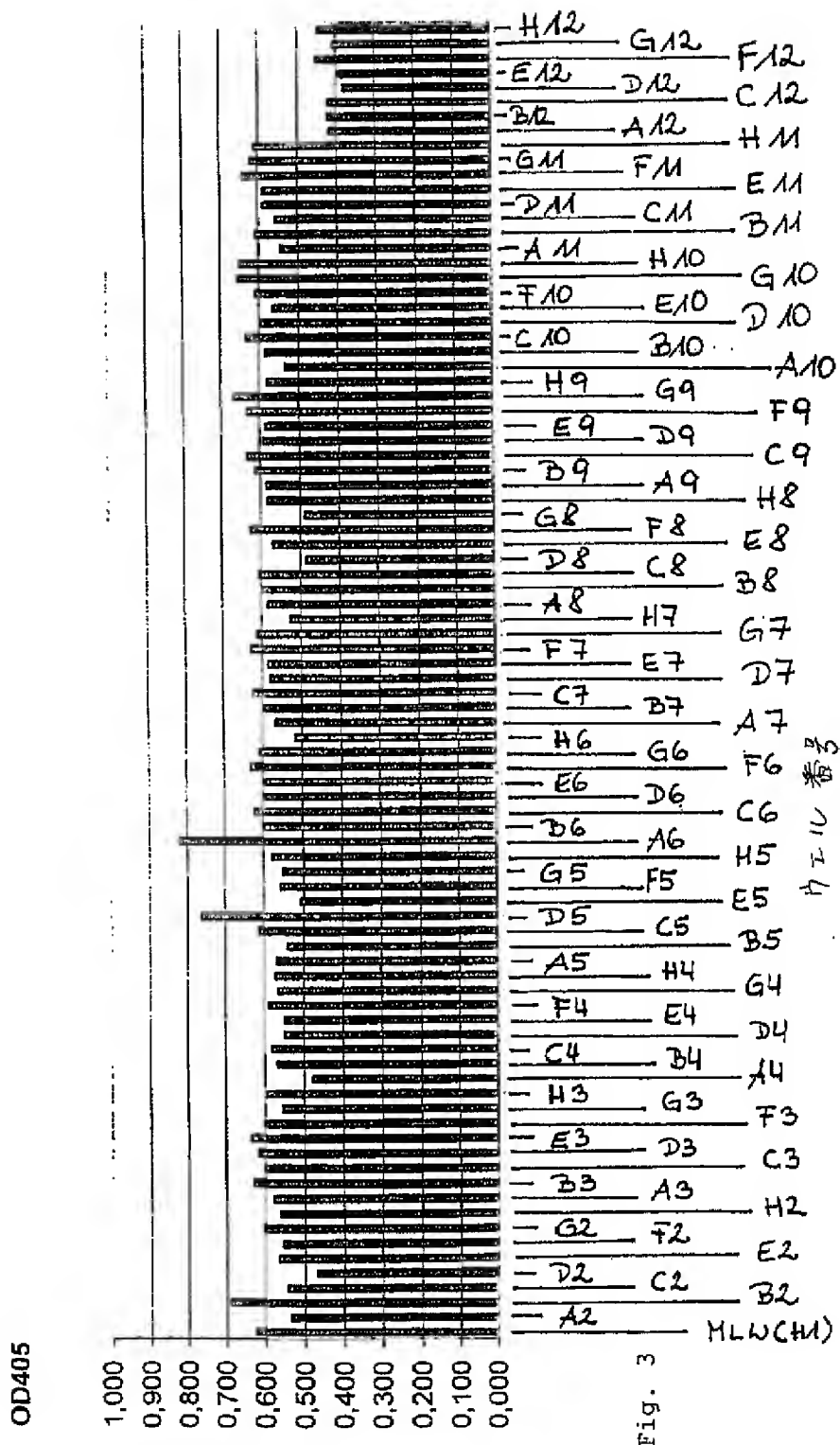


Fig. 1



OD405



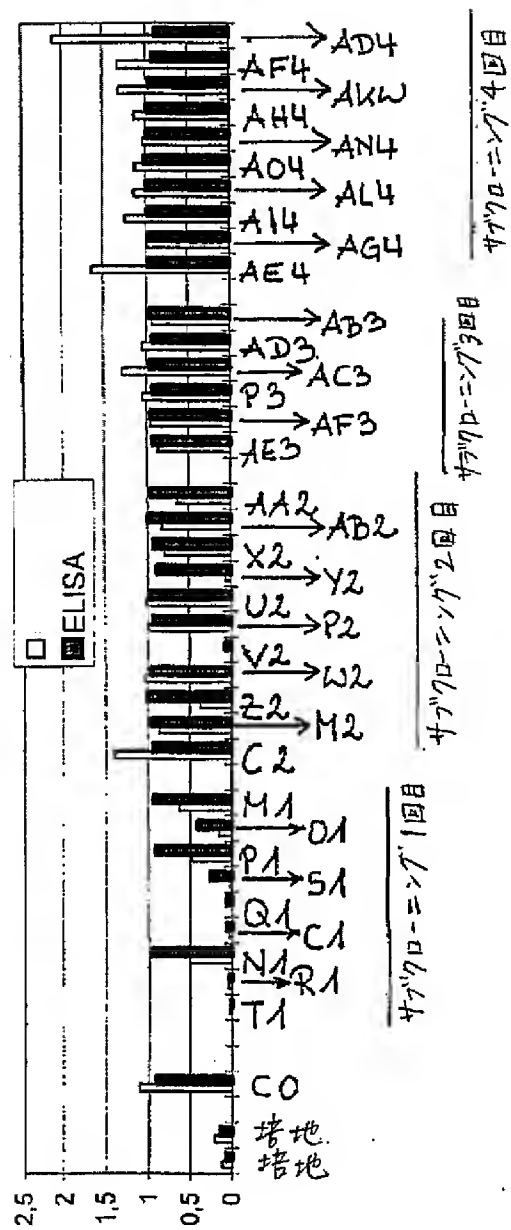


Fig. 4

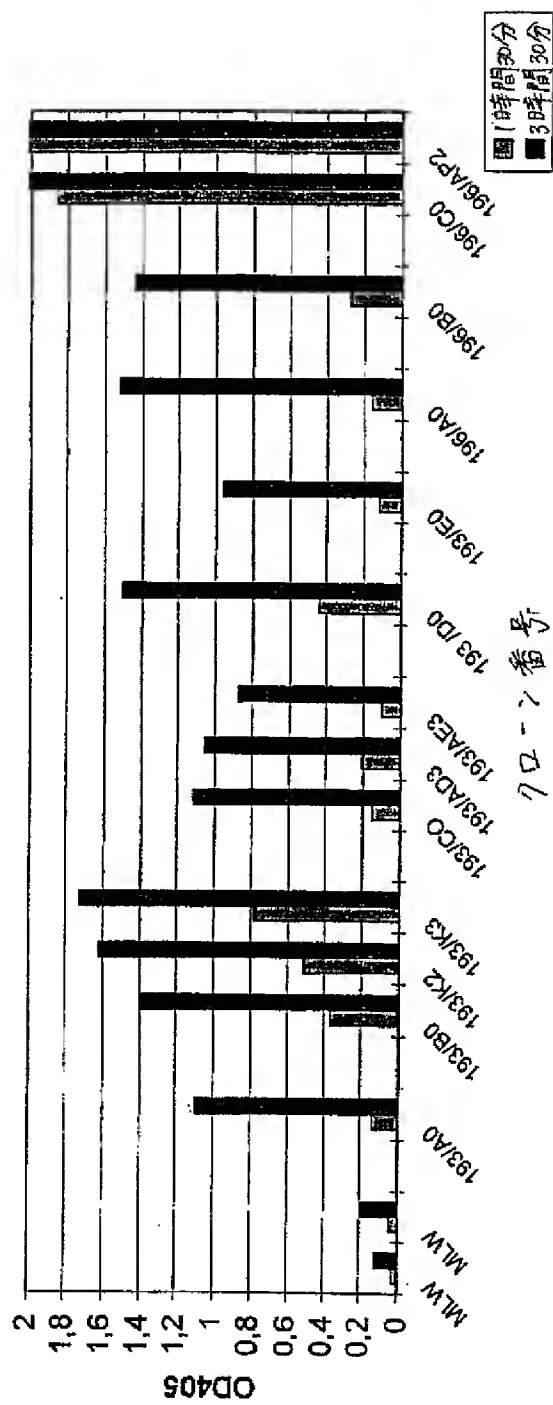


Fig. 5

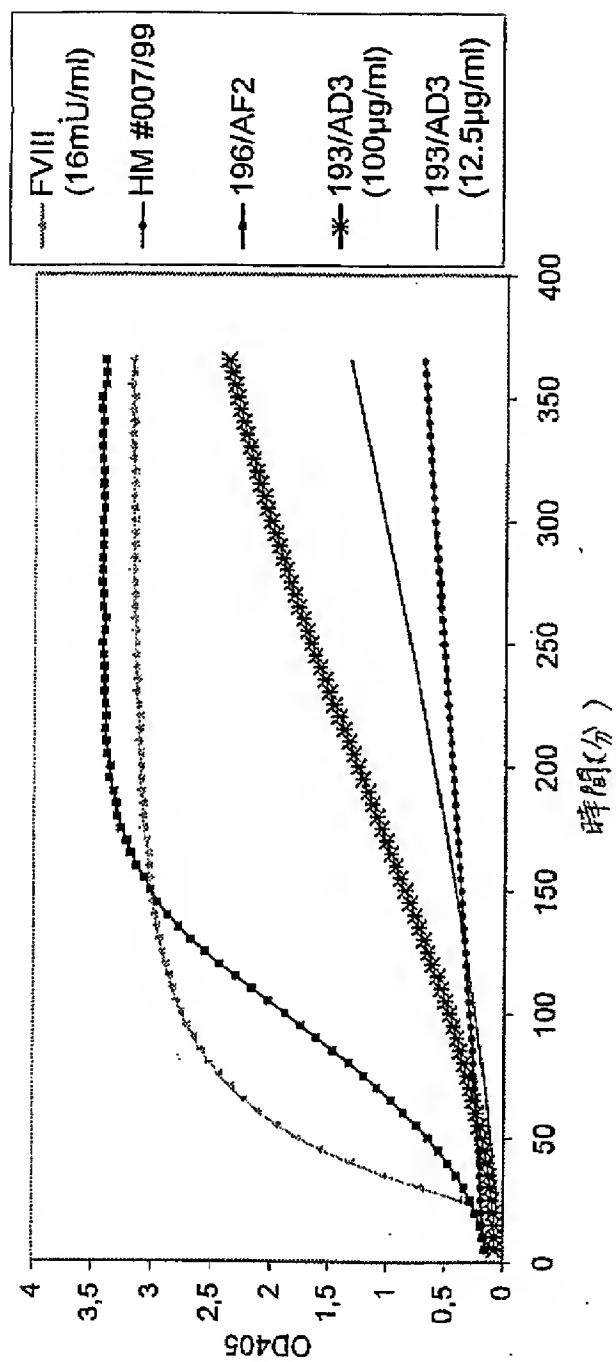


Fig. 6A

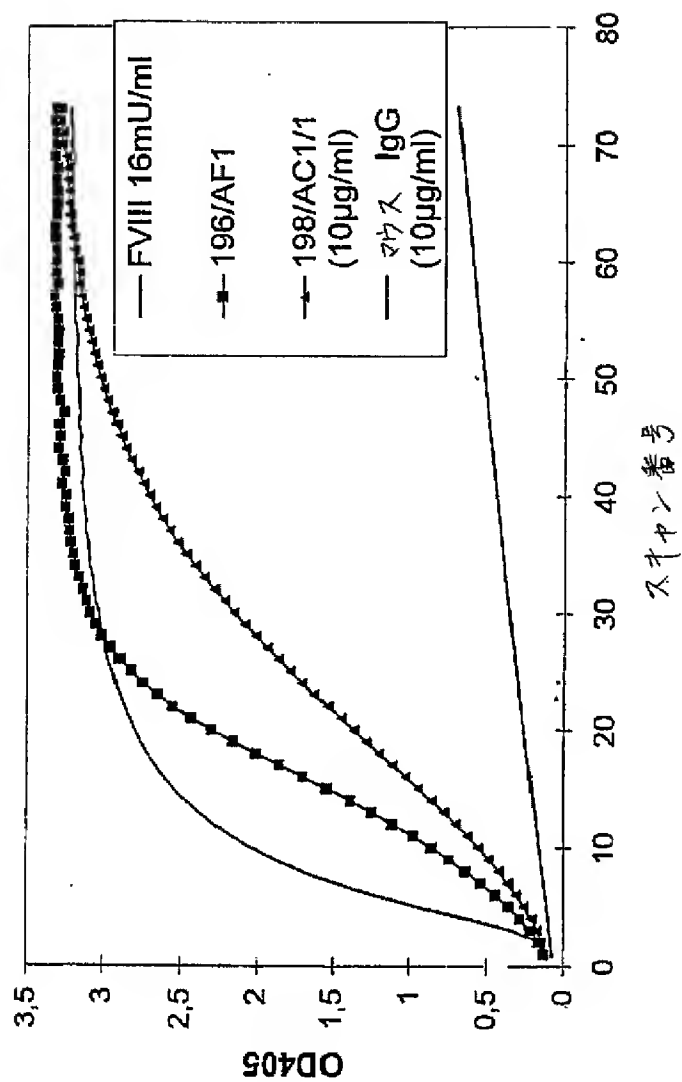


Fig. 6B

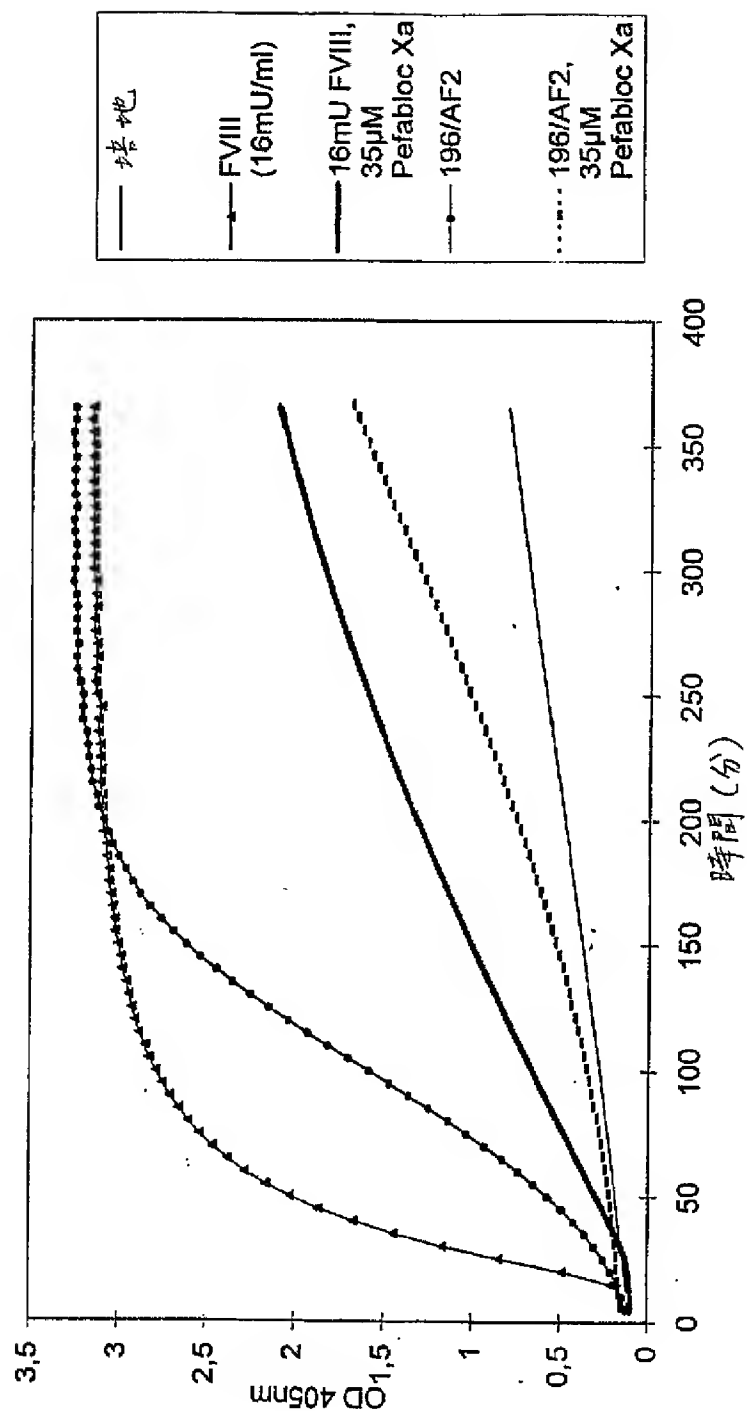


Fig. 7A

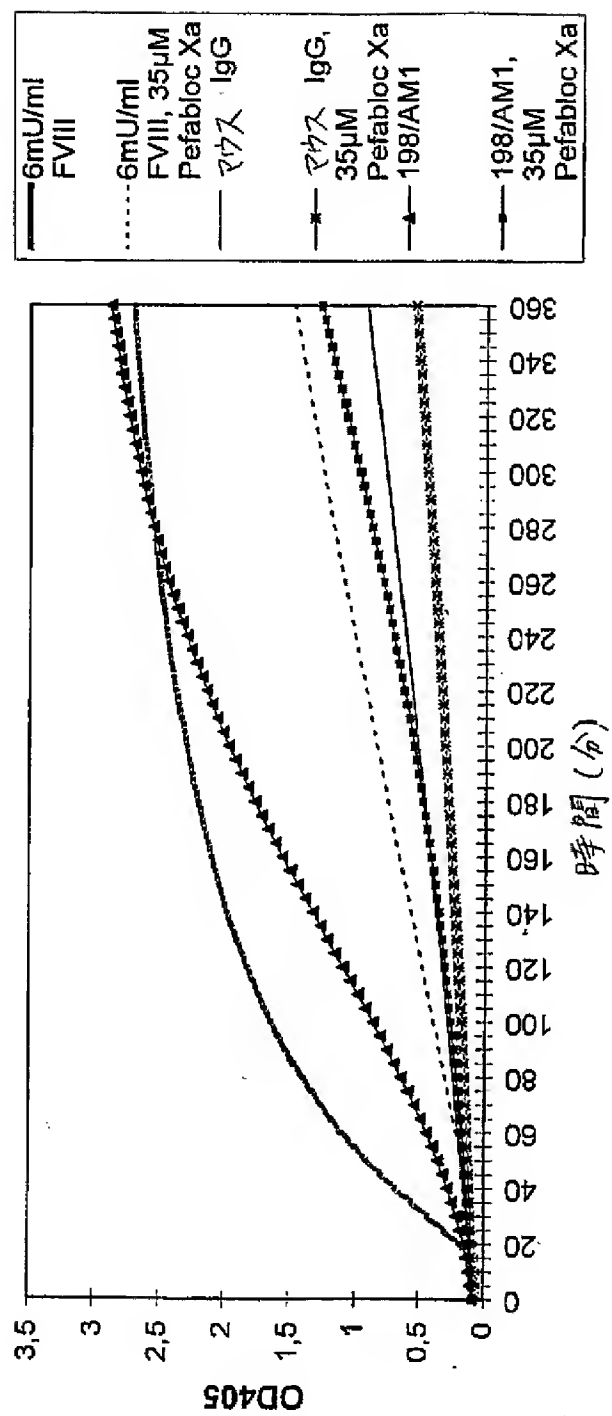


Fig. 7B

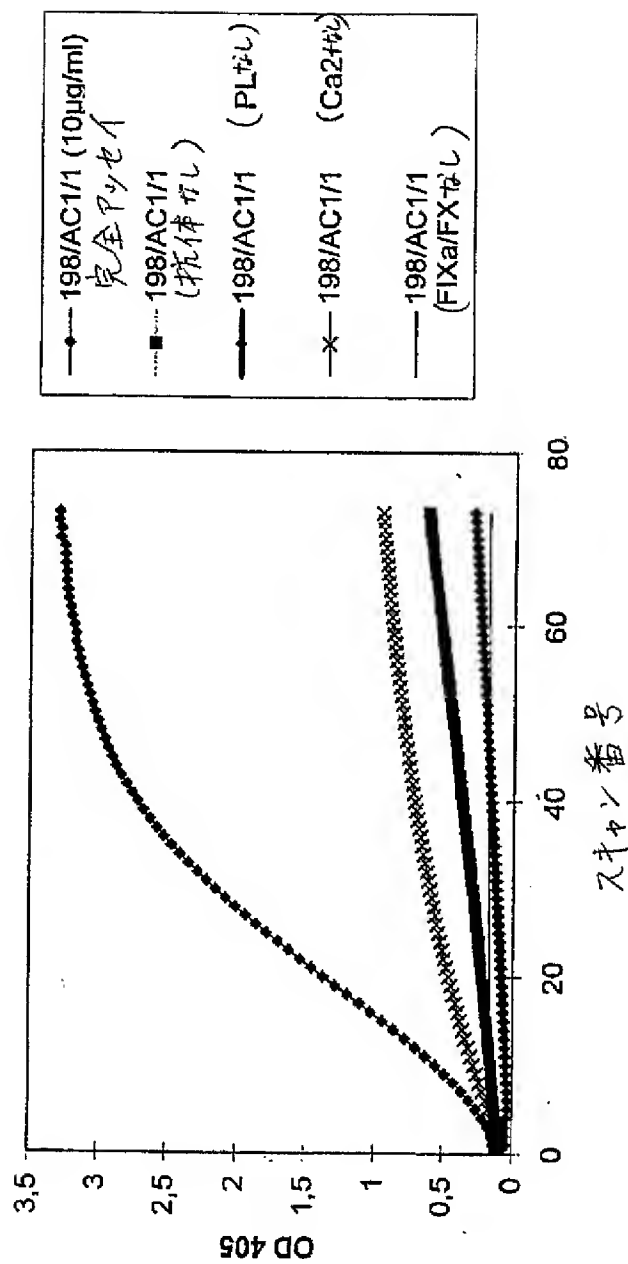


Fig. 8A

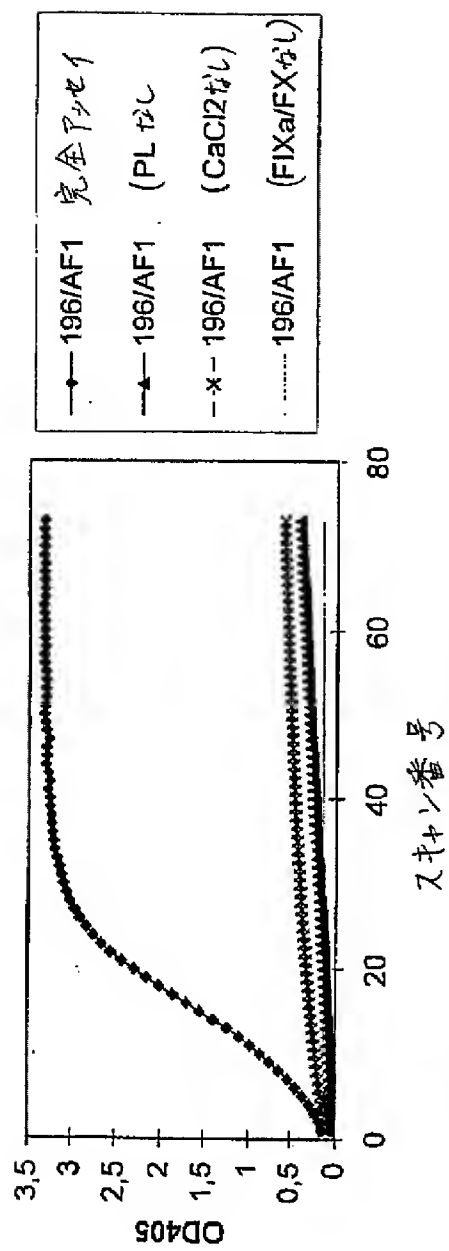


Fig. 8B

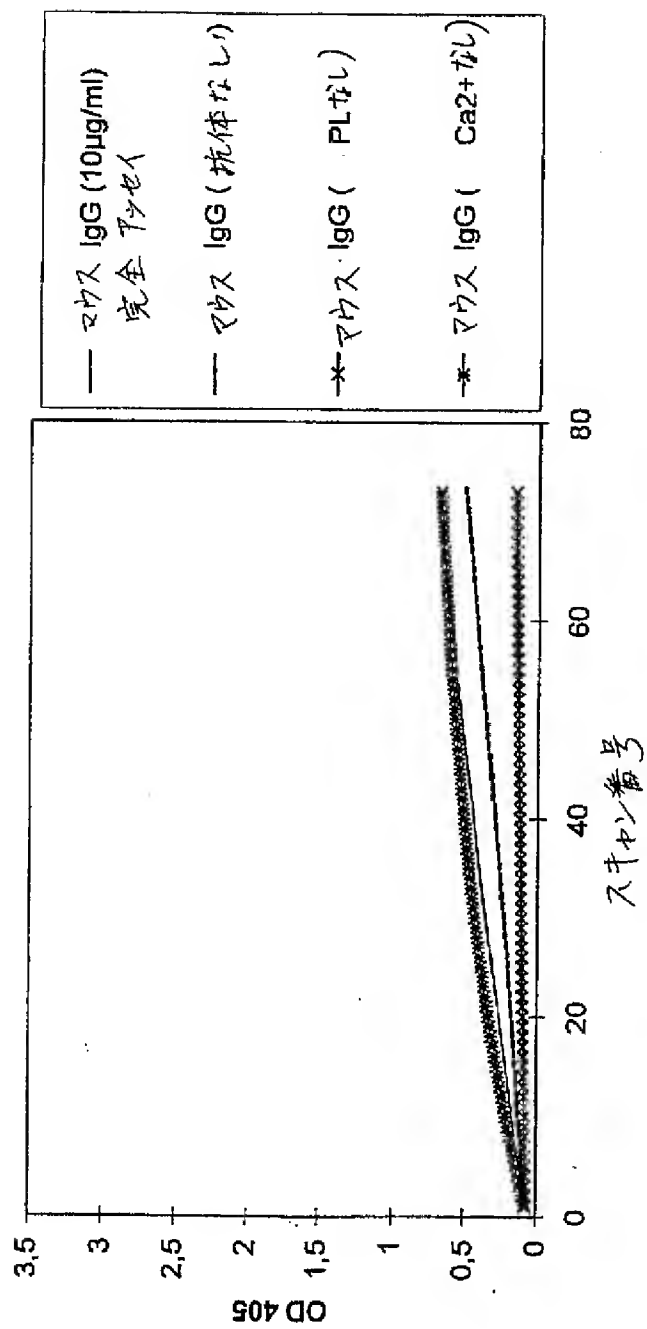


Fig. 8C

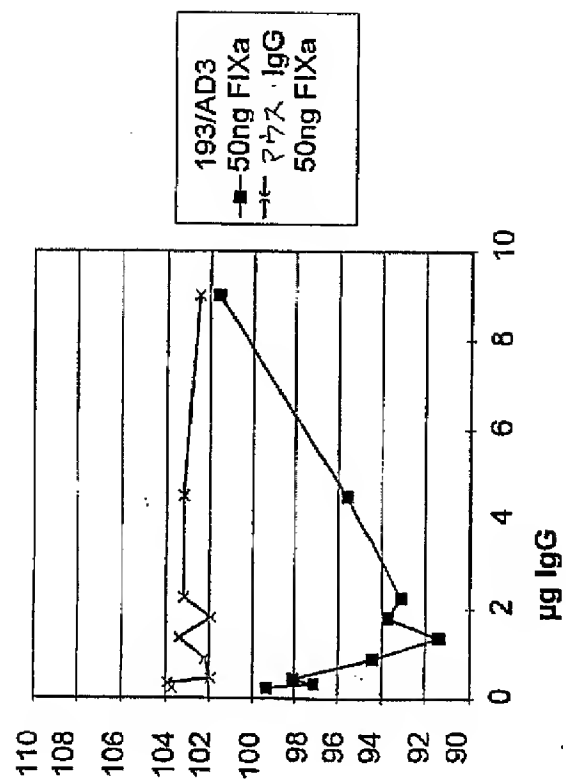


Fig.9

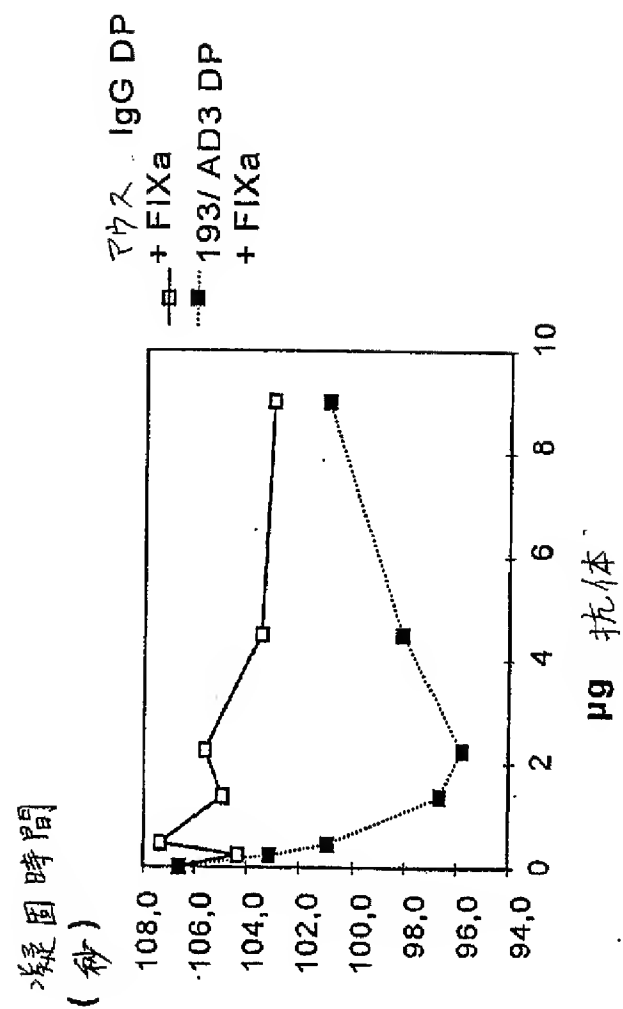


Fig. 10A

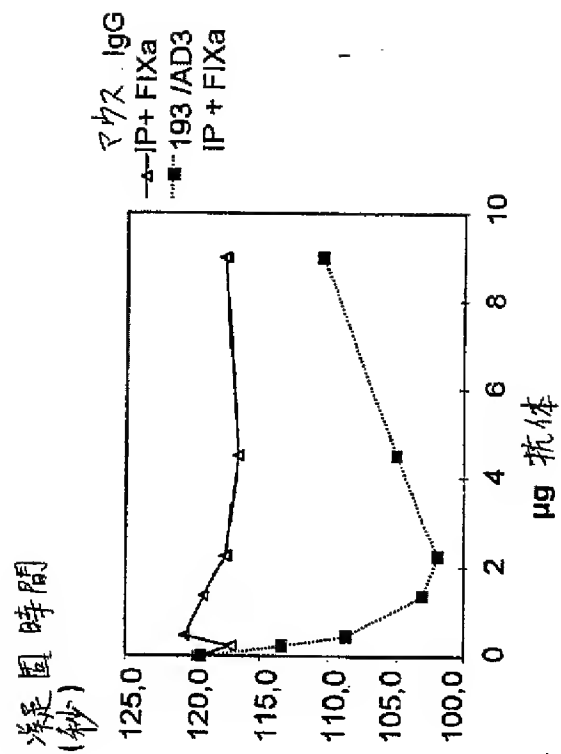


Fig. 10B

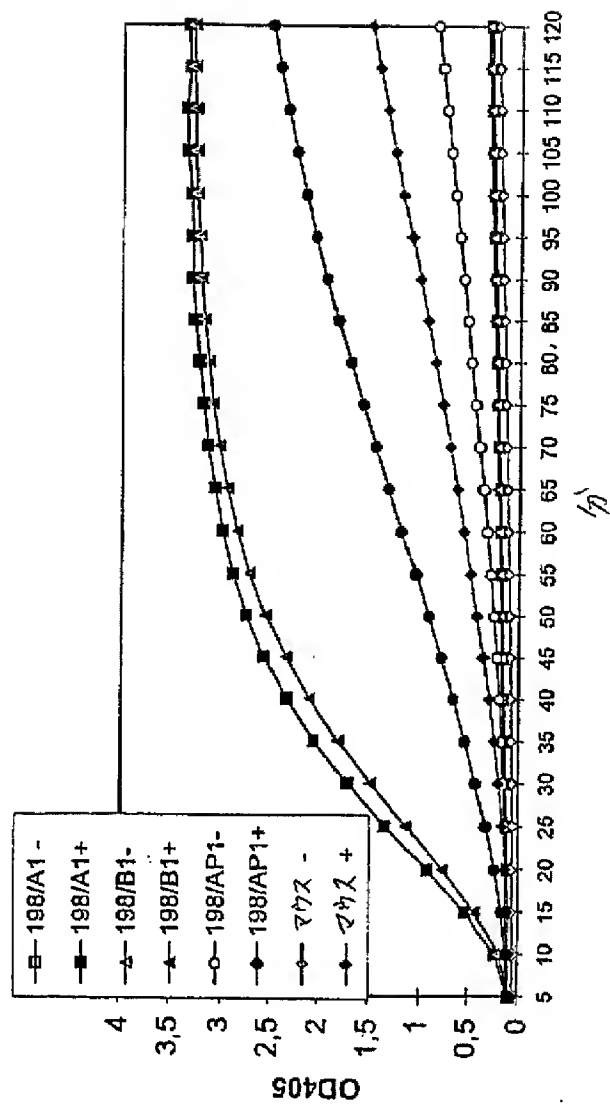


Fig.11

マウス V_H 逆方向プライマー (sf11-部位を含む):

VH1BACK-sf11 5' C ATG CCA TGA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTS MAR CTG CAG
SAG TCW GG 3' (SEQ.ID.NO. 50)

VH1BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA
GG 3' (SEQ.ID.NO. 51)

VH2BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCR
GG 3' (SEQ.ID.NO. 52)

VH3BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG AAG SAG TCA
GG 3' (SEQ.ID.NO. 53)

VH4/6BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 54)

VH5/9BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 55)

VH7BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 56)

VH8BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 57)

VH10BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAA GTG CAG CTG KTG GAG WCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 58)

VH11BACKSf1 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG ATC CAG TTG CTG CAG TCT
GG 3' (SEQ.ID.NO. 59)

F15. 12-1

(図 12 の 順 方 向)
 アウス JH 順 方 向 カライセ- (3 リンカ- 配列がは AseI- 部位を含む) :

VH1FOR2LiAsc	5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC 3' (SEQ.ID.NO. 60)
JH1FORLiAsc	5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3' (SEQ.ID.NO. 61)
JH2FORLiAsc	5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT GCC 3' (SEQ.ID.NO. 62)
JH3FORLiAsc	5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT CCC 3' (SEQ.ID.NO. 63)
JH4FORLiAsc	5' ACC GCC AGA GGC GCG CCC ACC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC 3' (SEQ.ID.NO. 64)

IUPAC-Code: M=A/C, W=A/T, R=A/G, Y=C/T, S=C/G, K=G/T, H=A/C/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=T/C/G.

Fig. 12-2

マウス V_k 遺伝子をクローニングしたためのプライマー

マウス V_k 逆方向プライマー (AscI-部位が $5'$ にリンカー配列を含む):

VK2BACK-LiAscI	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA 3' (SEQ.ID.NO. 65)
VK1BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG ATG WCA CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 66)
VK2BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT GTT KTG ATG ACC CAA ACT CC 3' (SEQ.ID.NO. 67)
VK3BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATT GTG ATR ACB CAG GCW GC 3' (SEQ.ID.NO. 68)
VK4BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACM CAR TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 69)
VK5BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG SAA AWT GTK CTC ACC CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 70)
VK6BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAY ATY VWG ATG ACM CAG WCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 71)
VK7BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CC 3' (SEQ.ID.NO. 72)
VK8BACKLi Asc	5' GGT TCA GAT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCA TTA TTG CAG GTG CTT GTG GG 3' (SEQ.ID.NO. 73)

Fig. 13-1

(図 13-2) マウスの NotI-部位を含有する (NotI-部位を含有する) :

JK1NOT10	5'	GAG	TCA	TTC	TGC	GGC	CGC	CCG	TTT	GAT	TTC	CAG	CTT	GGT	CCC	3'
		(SEQ.ID.NO. 74)														
JK2NOT10	5'	GAG	TCA	TTC	TGC	GGC	CGC	CCG	TTT	TAT	TTC	CAG	CTT	GGT	CCC	3'
		(SEQ.ID.NO. 75)														
JK3NOT10	5'	GAG	TCA	TTC	TGC	GGC	CGC	CCG	TTT	TAT	TTC	CAG	TCT	GGT	CCC	3'
		(SEQ.ID.NO.76)														
JK4NOT10	5'	GAG	TCA	TTC	TGC	GGC	CGC	CCG	TTT	TAT	TTC	CAA	CTT	TGT	CCC	3'
		(SEQ.ID.NO. 77)														
JK5NOT10	5'	GAG	TCA	TTC	TGC	GGC	CGC	CCG	TTT	CAG	CTC	CAG	CTT	GGT	CCC	3'
		(SEQ.ID.NO. 78)														

IUPAC-コード: K=G/T, M=A/C, W=A/T, R=A/G, Y=C/T, S=C/G, H=A/C/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=T/C/G.

Fig. 13-2

VH

+1 E V K L V E S G P E L K K P G
 1 GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA
 +1 E T V K I S C K A S G Y I F T
 46 GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ATC TTC ACA
 +1 N Y G M N W V K Q A P G K G L
 91 AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA
 +1 K W M G W I N T Y T G E P T Y
 136 AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC ACT GGA GAG CCA ACA TAT
 +1 A D D F K G R F A F S L E T S
 181 GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT
 +1 A S T A Y L Q I N N L K N E D
 226 GCC AGC ACT GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC
 +1 T A T Y F C A L Y G N S P K G
 271 ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA TTA TAT GGT AAC TCC CCT AAG GGG
 +1 F A Y W G Q G T L V T V S A G
 316 TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGC ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GGT
 +1 G G G S G G R A S G G G G G S D
 361 GGA GGC GGT TCA GGT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT
 +1 I Q M T Q S P K F L L V S A G
 406 ATT CAG ATG ACA CAG TCT CCC AAA TTC CTG CTT GTA TCA GCA GGA

11-11-

VL

Fig. 14-1

(14 の アミノ酸)

+1	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	S	N
451	GAC	AGG	GTT	ACC	ATA	ACC	TGC	AAG	GCC	AGT	CAG	AGT	GTG	AGT	AAT
+1	D	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L
496	GAT	GTA	GCT	TGG	TAC	CAA	CAG	AAG	CCG	GGG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTA
+1	L	M	Y	Y	A	S	N	R	Y	T	G	V	P	D	R
541	CTG	ATG	TAC	TAT	GCA	TCC	AAT	CGC	TAC	ACT	GGA	GTC	CCT	GAT	CGC
+1	F	T	G	S	G	Y	G	T	D	F	T	F	T	I	S
586	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TAT	GGG	ACG	GAT	TTC	ACT	TTC	ACC	ATC	AGC
+1	T	V	Q	A	E	D	L	A	V	Y	F	C	Q	Q	D
631	ACT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TTC	TGT	CAG	CAG	GAT
+1	Y	G	S	P	P	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I
676	TAT	GGC	TCT	CCT	CCC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATT
+1	K	R													
721	AAA	CGG													

Fig. 14-2

	VH		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G
+1	1	GAA	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	CTA	GTG	AAG	CCT	GGA	
+1	46	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	
		GGG	TCC	CTG	AAA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	
+1	91	T	Y	T	M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K	R	L	
		ACC	TAT	ACC	ATG	TCT	TGG	GTT	CGC	CAG	ACT	CCG	GAG	AAG	AGG	CTG	
+1	136	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	Y	T	Y	Y	
		GAG	TGG	GTC	GCA	ACC	ATT	AGT	AGT	GGT	GGT	AGT	TAC	ACC	TAC	TAT	
+1	181	P	D	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	
		CCA	GAC	AGT	GTG	AGG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	GCC	
+1	226	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D	
		AAG	AAC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AAG	TCT	GAG	GAC	
+1	271	T	A	M	Y	Y	C	T	R	D	G	G	H	G	Y	G	
		ACA	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	ACA	AGA	GAT	GGG	GGA	CAC	GGG	TAC	GGT	
+1	316	S	S	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	
		AGT	AGC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC	TCC	
+1	361	S	G	G	G	G	S	G	G	R	A	S	G	G	G	G	
		TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGT	GGG	CGC	GCC	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	
		VL															
+1	406	S	Q	I	V	L	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	S	
		TCG	CAA	ATT	GTG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	CTC	TCC	CTG	CCT	GTC	AGT	

Fig. 15-1

(15 の アラビア)

+1	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I
451	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	ATT
+1	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K
496	GTA	CAT	AGT	AAT	GGA	AAC	ACC	TAT	TTA	GAA	TGG	TAC	CTG	CAG	AAA
+1	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R
541	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC	CTG	ATC	TAC	AAA	GTT	TCC	AAC	CGA
+1	F	S	G	V	P	D	K	F	S	G	S	G	S	G	T
586	TTT	TCT	GGG	GTC	CCA	GAC	AAA	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA
+1	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G
631	GAT	TTC	ACA	CTC	AAG	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA
+1	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	W	T	F	G
676	GTT	TAT	TAC	TGC	TTT	CAA	GGT	TCA	CAT	GTT	CCG	TGG	ACG	TTC	GGT
1	G	G	T	K	L	E	I	K	R						
721	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG						

Fig. 15-2

+1 E V Q L Q E S G G L V K P G
 1 GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA
 +1 G S L K L S C A A S G F T F S
 46 GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT
 +1 S Y T M S W V R Q T P E K R L
 91 AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG
 +1 E W V A T I S S G G S S T Y Y
 136 GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT TCC ACC TAC TAT
 +1 P D S V K G R F T I S R D N A
 181 CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC
 +1 K N T L Y L Q M S S L R S E D
 226 AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC
 +1 T A M Y Y C T R E G G GGT TTC ACC GTC
 271 ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA GAG GGG GGT TTC ACC GTC
 +1 N W Y F D V W G A G T L V T V
 316 AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACT CTG GTC ACT GTC
 11>h-
 +1 S A G G G G S G G R A S G G G
 361 TCT GCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC
 VL
 +1 G S E N V L T Q S P A S L A V
 406 GGA TCG GAA AAT GTG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG

Fig. 16-1

(160773)

```

+1 S L G Q R A T I S C R A S E S
451 TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT

+1 V D S Y G Y N F M H W Y Q Q I
496 GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA

+1 P G Q P P K L L I Y R A S N L
541 CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA

+1 E S G I P A R F S G S G S R T
586 GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA

+1 D F T L T I N P V E A D D V A
631 GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA

+1 T Y Y C Q Q S N E D P L T F G
676 ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT

+1 T G T R L E I K R
721 ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA CGG

```

Fig.16 --2

VH

+1 E V Q L Q E S G G G L V K P G G S L K L
 1 GAG GTG CAG CTT CAG GAG TCA GGG GGA CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC
 CTC CAC GTC GAA GTC CTC AGT CCC CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG

+1 S C A A S G F I F S S Y T M S W V R Q T
 61 TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ATT TTT AGT AGT TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT
 AGG ACA CGT CGG AGA CCT AAG TAA AAA TCA TCA ATA TGG TAC AGA ACC CAA GCG GTC TGA

+1 P E K R L E W V A T I S S G S S T Y Y
 121 CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT TCC ACC TAC TAT
 GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TGG TAA TCA TCA CCA CCA TCA AGG TGG ATG ATA

+1 P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y
 181 CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC
 GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCT CTG TTA CCG TTC TGG GAC ATG

+1 L Q M S S L K S E D T A M Y H C T R E G
 241 CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA CCC ATG TAT CAC TGT ACA AGA GAG GGG
 GAC GTT TAC TCG TCA GAC TTC AGA CTC CTG TGT CGG TAC ATA GTG ACA TGT TCT CTC CCC

+1 G G Y Y V N W Y F D V W G A G T T L T V
 301 GGT GGT TAT TAC GTC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGC ACC ACT CTC ACA GTC
 CCA CCA ATA ATG CAG TTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG CGT CCG TGG TGA GAG TGT CAG

VZ

+1 S S S G G G S G S G R A S G G G G S D I E
 361 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGC CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG
 AGG AGT CCA CCT CGG CCA AGT CCA CCC GCG CGG AGA CCG CCA CCG CCT AGC CTG TAA CTC

+1 L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C
 421 CTC ACN CAG TCT CCA GCT TCT TTG GGT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC
 GAG TGN GTC AGA GGT CGA AGA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CGG TGG TAT AGG ACG

Fig. 11-1

(170777)

```

+1 R A S E S V D S Y G K S F M H W Y Q Q K
481 AGA GCC AGT GAA AGT GAT AGT TAT GGC AAG AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA
TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG TTC TCA AAA TAC GTG ACC ATG GTC GTC JTT

+1 P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P
541 CCA GGG CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG ATC CCT
GGT CCC GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC TAG GGA

+1 A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E
601 GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG
CGG TCC AAG TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG GAG TGG TAA TTA GGA CAC CTC

+1 A D D V A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G
661 GCT GAT GAT GTT GCN ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCC CTC ACG TTC GGT
CGA CTA CTA CAA CGN TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA CTC CTA GGG GAG TGC AAG CCA

+1 A G T R L E I K R
721 GCT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA CGG
CGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT GCC

```

Fig. 17-2

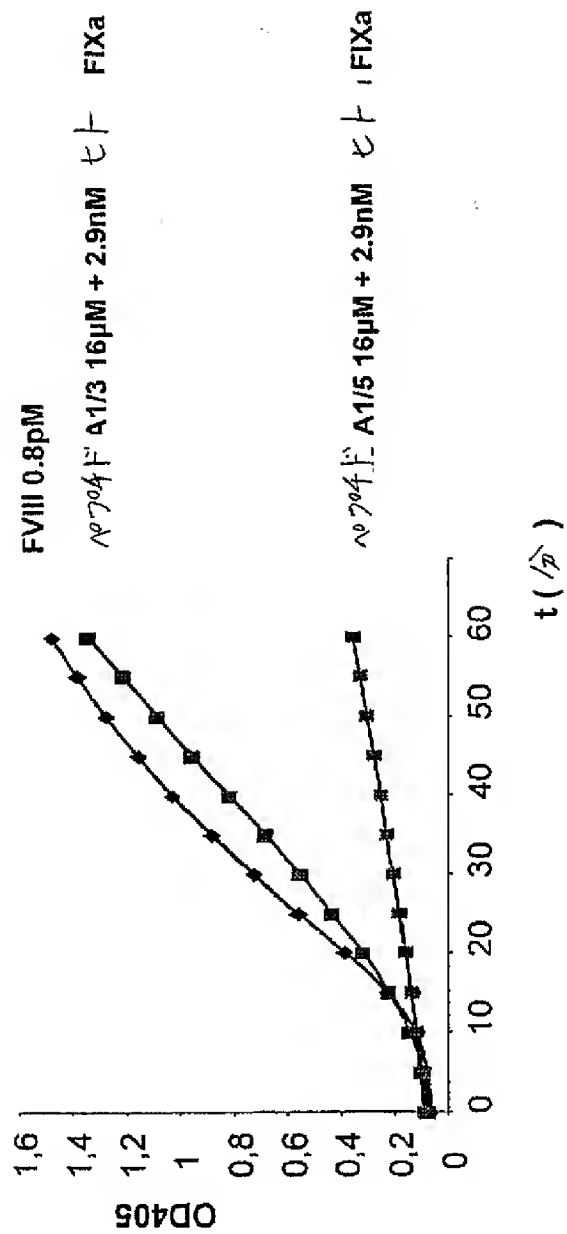


Fig. 18

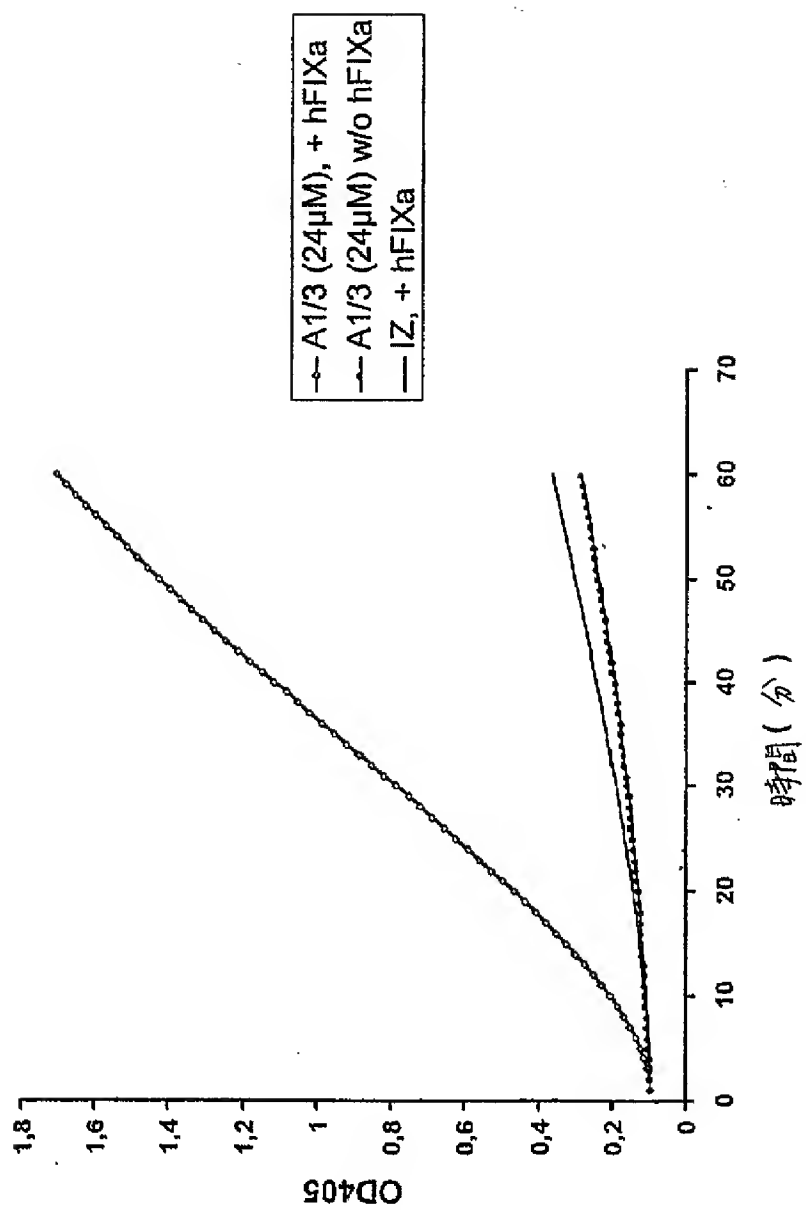


Fig. 19

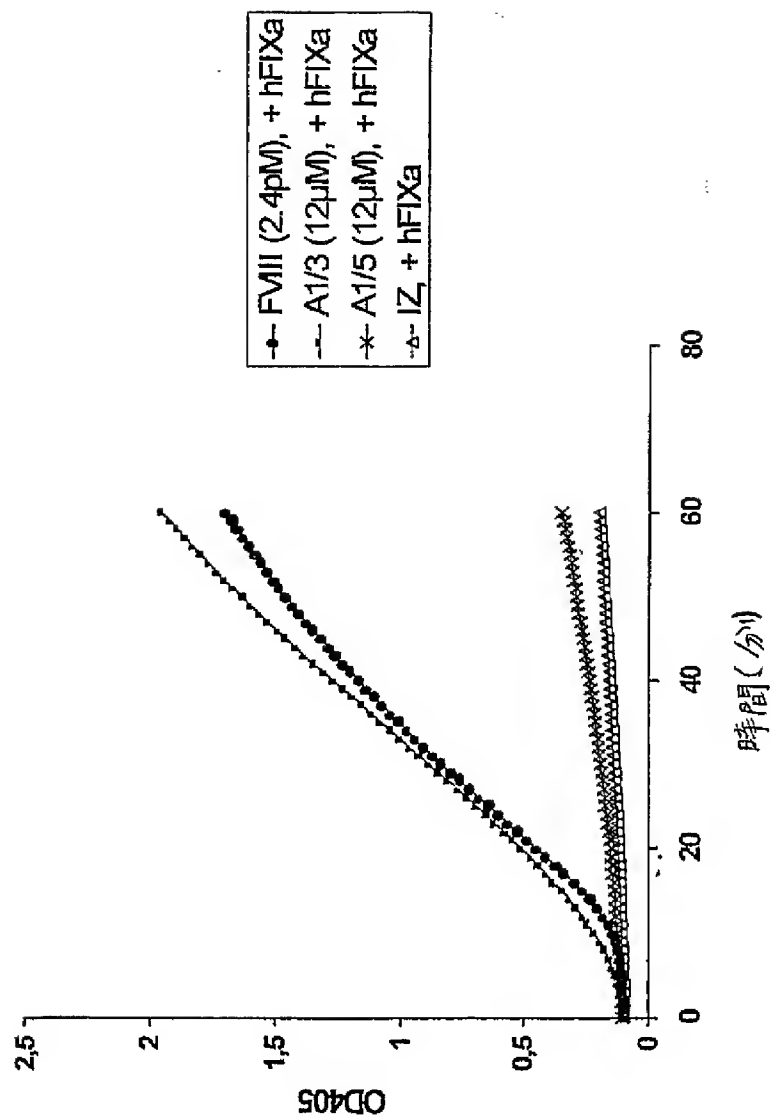


Fig. 20

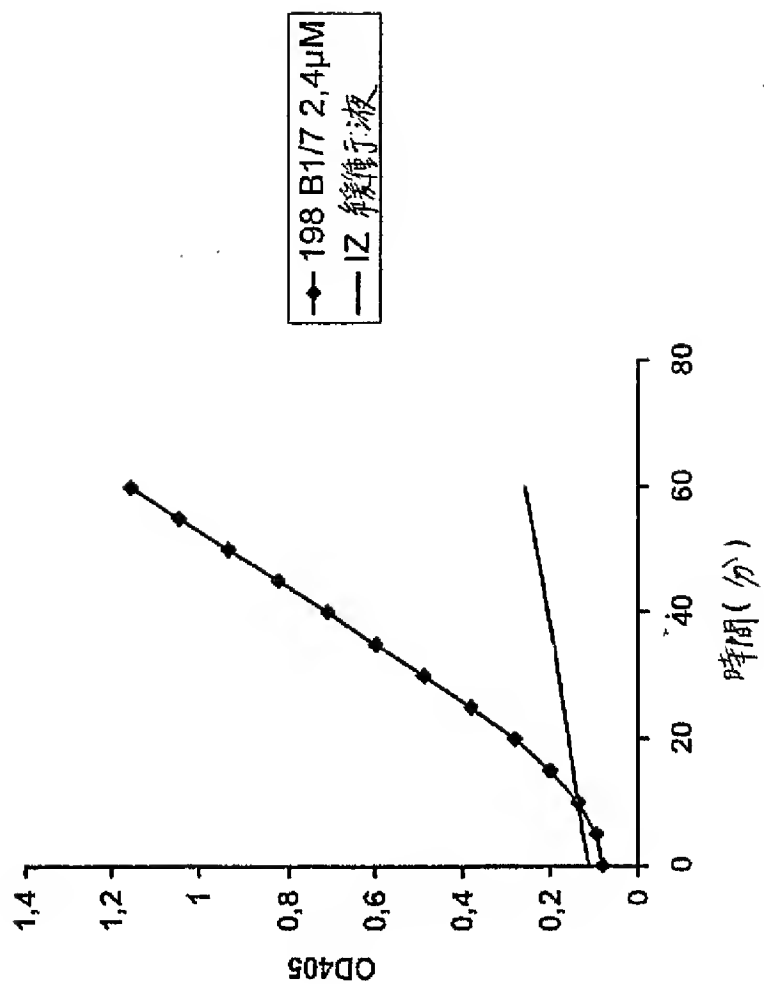


Fig. 21

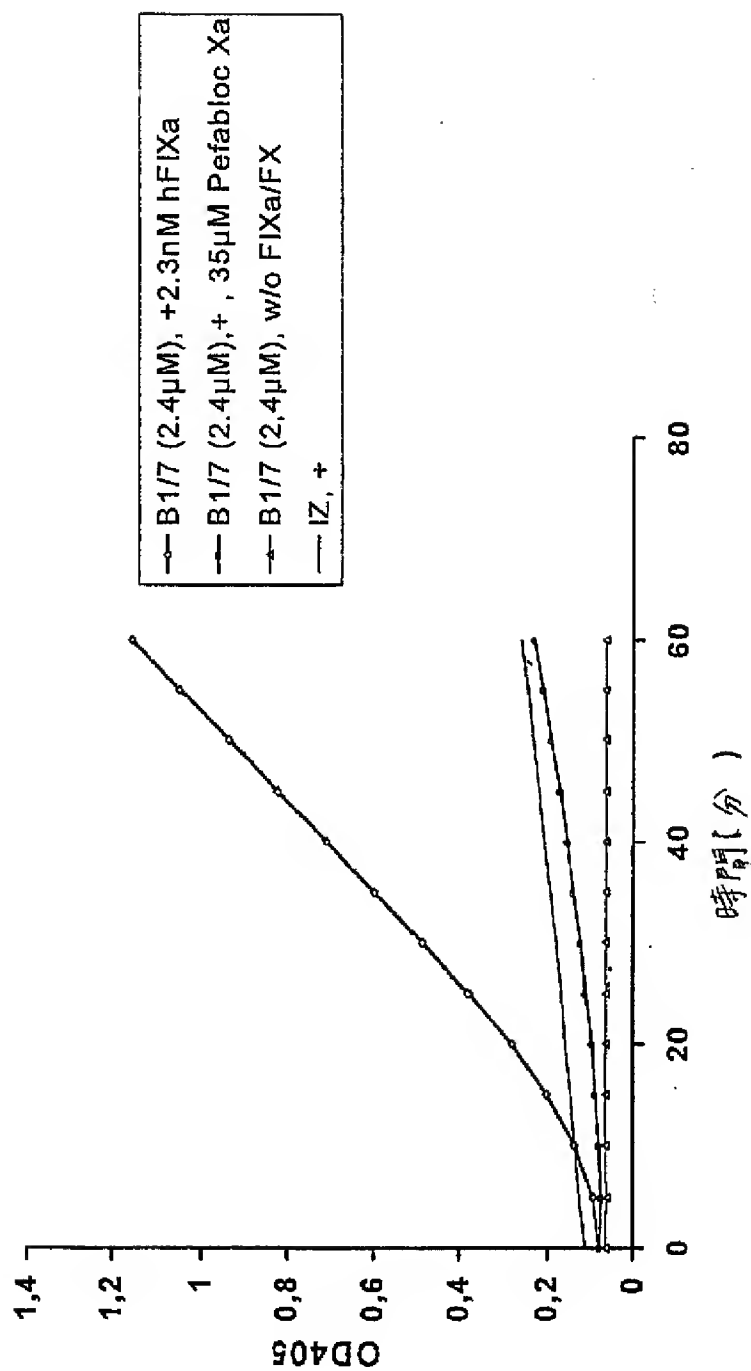


Fig. 22

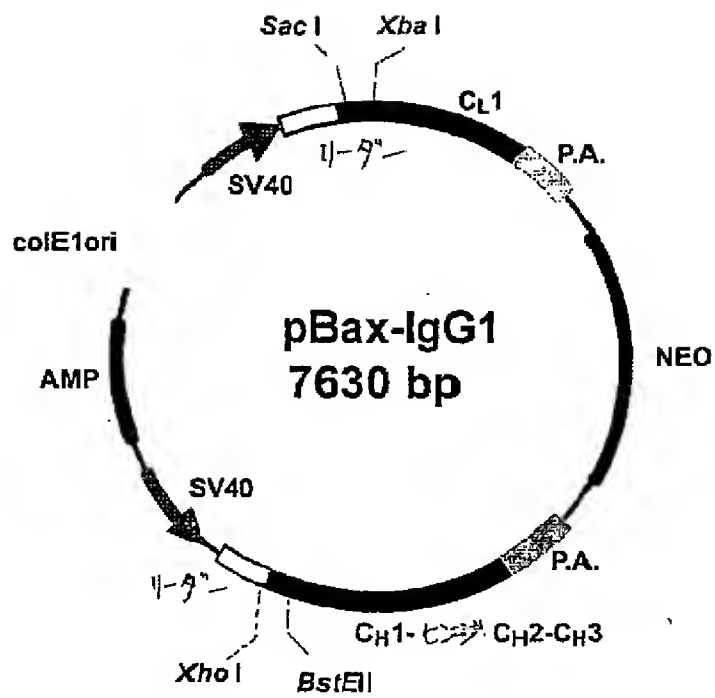


Figure 23

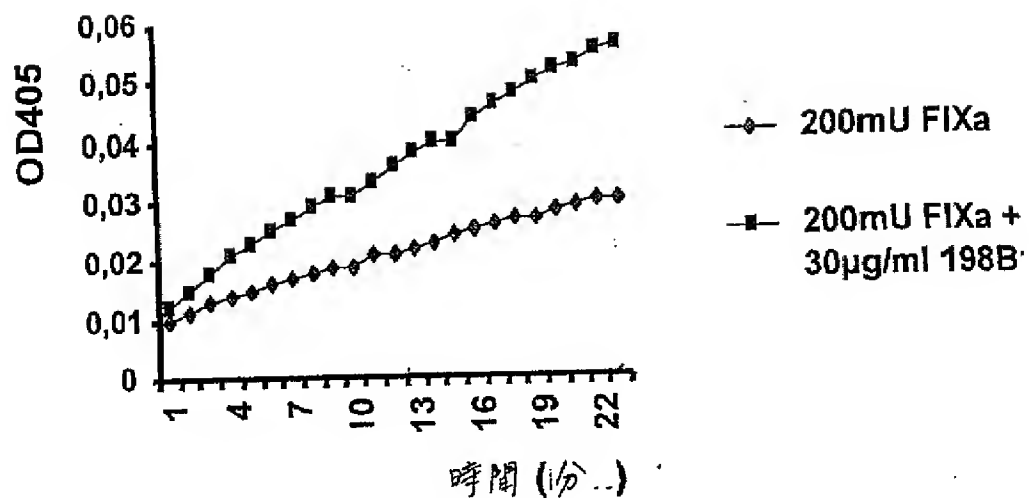


Fig. 24A

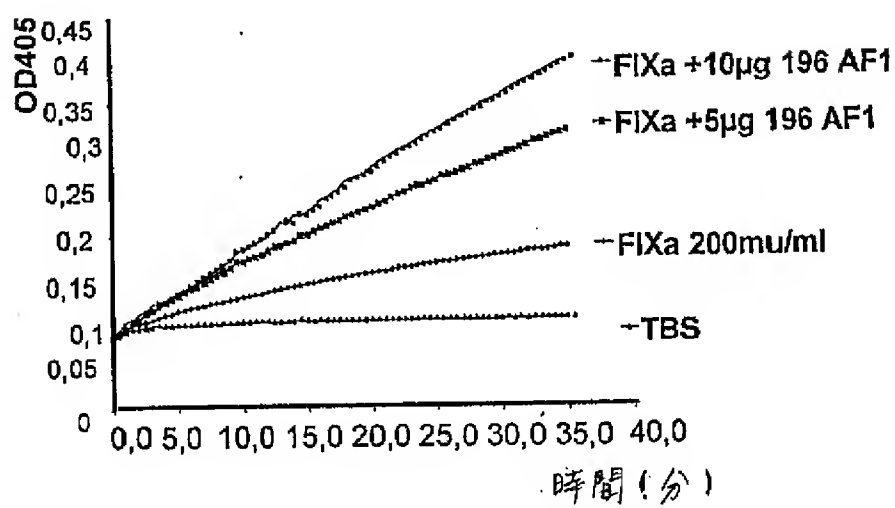


Fig. 24B

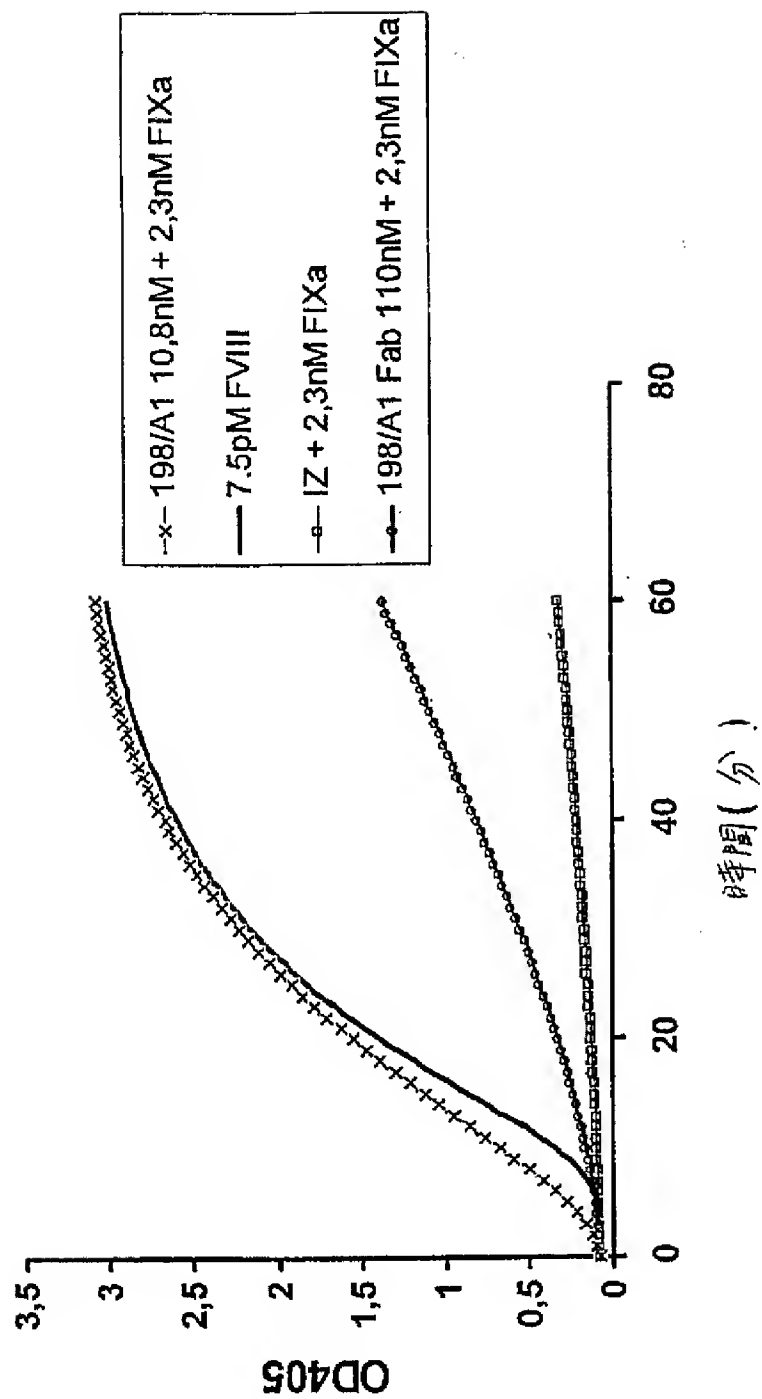


Fig. 25

PelB-1/-9 ¹¹														
+1	M	K	Y	L	L	P	T	A	A	A	G	L	L	L
1	ATG	AAA	TAC	CTA	TTG	CCT	ACG	GCA	GCC	GCT	GGA	TTG	TTA	TTA
	TAC	TTT	ATG	GAT	AAC	GGA	TGC	CGT	CGG	CGA	CCT	AAC	AAT	AAT
VH														
+1	L	A	A	Q	P	A	M	A	E	V	K	L	V	E
43	CTC	GCG	GCC	CAG	CCG	GCC	ATG	GCG	GAG	GTG	AAG	CTG	GTG	GAG
	GAG	CGC	CGG	GTC	GGC	CGG	TAC	CGC	CTC	CAC	TTC	GAC	CAC	CTC
+1	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L
85	TCT	GGG	GGA	GGC	TTA	GTG	AAG	CCT	GGA	GGG	TCC	CTG	AAA	CTC
	AGA	CCC	CCT	CCG	AAT	CAC	TTC	GGA	CCT	CCC	AGG	GAC	TTT	GAG
+1	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	T	M
127	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	AGT	AGC	TAT	ACC	ATG
	AGG	ACA	CGT	CGG	AGA	CCT	AAG	TGA	AAG	TCA	TCG	ATA	TGG	TAC
+1	S	W	V	R	Q	T	P	E	K	R	L	E	W	V
169	TCT	TGG	GTT	CGC	CAG	ACT	CCG	GAG	AAG	AGG	CTG	GAG	TGG	GTC
	AGA	ACC	CAA	GCG	GTC	TGA	GGC	CTC	TTC	TCC	GAC	CTC	ACC	CAG
+1	A	T	I	S	S	G	G	S	S	T	Y	Y	P	D
211	GCA	ACC	ATT	AGT	AGT	GGN	GGT	AGT	TCC	ACC	TAC	TAT	CCA	GAC
	CGT	TGG	TAA	TCA	TCA	CCN	CCA	TCA	AGG	TGG	ATG	ATA	GGT	CTG
+1	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K
253	AGT	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	GCC	AAG
	TCA	CAC	TTC	CCG	GCT	AAG	TGG	TAG	AGG	TCT	CTG	TTA	CGG	TTC
+1	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D
295	AAC	ACC	CTG	TAC	CTG	CAA	ATG	AGC	AGT	CTG	AGG	TCT	GAG	GAC
	TTG	TGG	GAC	ATG	GAC	GTT	TAC	TCG	TCA	GAC	TCC	AGA	CTC	CTG
+1	T	A	M	Y	Y	C	T	R	E	G	G	G	F	T
337	ACA	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	ACA	AGA	GAG	GGG	GGT	GGT	TTC	ACC
	TGT	CGG	TAC	ATA	ATG	ACA	TGT	TCT	CTC	CCC	CCA	CCA	AAG	TGG
+1	V	N	W	Y	F	D	V	W	G	A	G	T	S	V
379	GTC	AAC	TGG	TAC	TTC	GAT	GTC	TGG	GGC	GCA	GGA	ACC	TCA	GTC
	CAG	TTG	ACC	ATG	AAG	CTA	CAG	ACC	CCG	CGT	CCT	TGG	AGT	CAG
11>カ-														
+1	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	G	R	A	S
421	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGT	GGG	CGC	GCC	TCT
	TGG	CAG	AGG	AGT	CCA	CCT	CCG	CCA	AGT	CCA	CCC	GCG	CGG	AGA

Fig. 26-1

(四) 26の77き)

						VL													
+1	G	G	G	G	S	D	I	V	L	T	Q	S	P	A					
463	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAC	ATT	GTG	CTG	ACA	CAG	TCT	CCA	GCT					
	CCG	CCA	CCG	CCT	AGC	CTG	TAA	CAC	GAC	TGT	GTC	AGA	GGT	CGA					
+1	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C					
505	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATA	TCC	TGC					
	AGA	AAC	CGA	CAC	AGA	GAT	CCC	GTC	TCC	CGG	TGG	TAT	AGG	ACG					
+1	R	A	S	E	S	V	D	S	Y	G	Y	N	F	M					
547	AGA	GCC	AGT	GAA	AGT	GTT	GAT	AGT	TAT	GGC	TAT	AAT	TTT	ATG					
	TCT	CGG	TCA	CTT	TCA	CAA	CTA	TCA	ATA	CCG	ATA	TTA	AAA	TAC					
+1	H	W	Y	Q	Q	I	P	G	Q	P	P	K	L	L					
589	CAC	TGG	TAT	CAG	CAG	ATA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC					
	GTG	ACC	ATA	GTC	GTC	TAT	GGT	CCT	GTC	GGT	GGG	TTT	GAG	GAG					
+1	I	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R					
631	ATC	TAT	CGT	GCA	TCC	AAC	CTA	GAG	TCT	GGG	ATC	CCT	GCC	AGG					
	TAG	ATA	GCA	CGT	AGG	TTG	GAT	CTC	AGA	CCC	TAG	GGA	CGG	TCC					
+1	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I					
673	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	AGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	ACC	ATT					
	AAG	TCA	CCG	TCA	CCC	AGA	TCC	TGT	CTG	AAG	TGG	GAG	TGG	TAA					
+1	N	P	V	E	A	D	D	V	A	T	Y	Y	C	Q					
715	AAT	CCT	GTG	GAG	GCT	GAT	GAT	GTT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	CAG					
	TTA	GGA	CAC	CTC	CGA	CTA	CTA	CAA	CGT	TGG	ATA	ATG	ACA	GTC					
+1	Q	S	N	E	D	P	L	T	F	G	T	G	T	R					
757	CAA	AGT	AAT	GAG	GAT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	ACT	GGG	ACC	AGA					
	GTT	TCA	TTA	CTC	CTA	GGC	GAG	TGC	AAG	CCA	TGA	CCC	TGG	TCT					
+1	L	E	I	K	R	A	A	A	A	R	A	P	E	M					
799	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	GCC	CGG	GCA	CCA	GAA	ATG					
	GAC	CTT	TAT	TTT	GCC	GCG	CGG	CGT	CGG	GCC	CGT	GGT	CTT	TAC					
+1	P	V	L	E	N	R	A	A	Q	G	D	I	T	A					
841	CCT	GTT	CTG	GAA	AAC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	ACT	GCA					
	GGA	CAA	GAC																

Fig. 26-2

(26977⁴)

```

+1 L L I G D G M G D S E I T A
967 TTG CTG ATT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC
AAC GAC TAA CCG CTA CCC TAC CCC CTG AGC CTT TAA TGA CGG

+1 A R N Y A E G A G G F F K G
1009 GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT
CGT GCA TTA ATA CGG CTT CCA CGC CCG CCG AAA AAA TTT CCA

+1 I D A L P L T G Q Y T H Y A
1051 ATA GAT GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG
TAT CTA CGG AAT GGC GAA TGG CCC GTT ATG TGA GTG ATA CGC

+1 L N K K T G K P D Y V T D S
1093 CTG AAT AAA AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG
GAC TTA TTT TTT TGG CCG TTT GGC CTG ATG CAG TGG CTG AGC

+1 A A S A T A W S T G V K T Y
1135 GCT GCA TCA GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT
CGA CGT AGT CGT TGG CGG ACC AGT TGG CCA CAG TTT TGG ATA

+1 N G A L G V D I H E K D H P
1177 AAC GGC GCG CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA
TTG CCG CGC GAC CCG CAG CTA TAA GTG CTT TTT CTA GTG GGT

+1 T I L E M A K A A G L A T G
1219 ACG ATT CTG GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT
TGC TAA GAC CTT TAC CGT TTT CGG CGT CCA GAC CGC TGG CCA

+1 N V S T A E L Q D A T P A A
1261 AAC GTT TCT ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG
TTG CAA AGA TGG CGT CTC AAC GTC CTA CGG TGC GGG CGA CGC

+1 L V A H V T S R K C Y G P S
1303 CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC
GAC CAC CGT GTA CAC TGG AGC GCG TTT ACG ATG CCA GGC TCG

+1 A T S E K C P G N A L E K G
1345 GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC
CGC TGG TCA CTT TTT ACA GGC CCA TTG CGA GAC CTT TTT CCG

+1 G K G S I T E Q L L N A R A
1387 GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC
CCT TTT CCT AGC TAA TGG CTT GTC GAC GAA TTG CGA GCA CGG

+1 D V T L G G G A K T F A E T
1429 GAC GTT ACG CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG
CTG CAA TGC GAA CCG CCG CCG CGT TTT TGG AAA CGA CTT TGC

```

Fig. 26-3

(図26のつぎ)

```

+1  A  T  A  G  E  W  Q  G  K  T  L  R  E  Q
1471 GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG
      CGT TGG CGA CCA CTT ACC GTC CCT TTT TGC GAC GCA CTT GTC

+1  A  Q  A  R  G  Y  Q  L  V  S  D  A  A  S
1513 GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA
      CGT GTC CGC GCA CCA ATA GTC AAC CAC TCG CTA CGA CGG AGT

+1  L  N  S  V  T  E  A  N  Q  Q  K  P  L  L
1555 CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT
      GAC TTA AGC CAC TGC CTT CGC TTA GTC GTT TTT GGG GAC GAA

+1  G  L  F  A  D  G  N  M  P  V  R  W  L  G
1597 GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA
      CCG GAC AAA CGA CTG CCG TTA TAC GGT CAC GCG ACC GAT CCT

+1  P  K  A  T  Y  H  G  N  I  D  K  P  A  V
1639 CCG AAA GCA ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC
      GGC TTT CGT TGC ATG GTA CCG TTA TAG CTA TTC GGG CGT CAG

+1  T  C  T  P  N  P  Q  R  N  D  S  V  P  T
1681 ACC TGT ACG CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC
      TGG ACA TGC GGT TTA GGC GTT GCA TTA CTG TCA CAT GGT TGG

+1  L  A  Q  M  T  D  K  A  I  E  L  L  S  K
1723 CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA
      GAC CGC GTC TAC TGG CTG TTT CGG TAA CTT AAC AAC TCA TTT

+1  N  E  K  G  F  F  L  Q  V  E  G  A  S  I
1765 AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC
      TTA CTC TTT CCG AAA AAG GAC GTT CAA CTT CCA CGC AGT TAG

+1  D  K  Q  D  H  A  A  N  P  C  G  Q  I  G
1807 GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC
      CTA TTT GTC CTA GTA CGA CGC TTA GGA ACG CCC GTT TAA CCG

+1  E  T  V  D  L  D  E  A  V  Q  R  A  L  E
1849 GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA
      CTC TGC CAG CTA GAG CTA CTT CGG CAT GTT GCC CGC GAC CTT

+1  F  A  K  K  E  G  N  T  L  V  I  V  T  A
1891 TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT
      AAG CGA TTT TTC CTC CCA TTG TGC GAC CAG TAT CAG TGG CGA

+1  D  H  A  H  A  S  Q  I  V  A  P  D  T  K
1933 GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA
      CTA GTG CGG GTG CGG TCG GTC TAA CAA CGC GGC CTA TGG TTT

+1  A  P  G  L  T  Q  A  L  N  T  K  D  G  A
1975 GCT CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA
      CGA GGC CCG GAG TGG GTC CGC GAT TTA TGG TTT CTA CCG CGT

```

Fig. 26-4

(図26の続き)

```

+1 V M V M S Y G N S E E D S Q
2017 GTG ATG GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA
CAC TAC CAC TAC TCA ATG CCC TTG AGG CTT CTC CTA AGT GTT

+1 E H T G S Q L R I A A Y G P
2059 GAA CAT ACC GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG
CTT GTA TGG CCG TCA GTC AAC GCA TAA CGC CGC ATA CCG GGC

+1 H A A N V V G L T D Q T D L
2101 CAT GCC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC
GTA CGG CGG TTA CAA CAA CCT GAC TGG CTG GTC TGG CTA GAG

+1 F Y T M K A A L G D I His tag
2143 TTC TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG GAT ATC GCA CAC CAT
AAG ATG TGG TAC TTT CGG CGA GAC CCC CTA TAG CGT GTG GTA

+1 H H H H *
2185 CAC CAT CAC CAT TAA
GTG GTA GTG GTA ATT
  
```

Fig. 26-5

【図27】

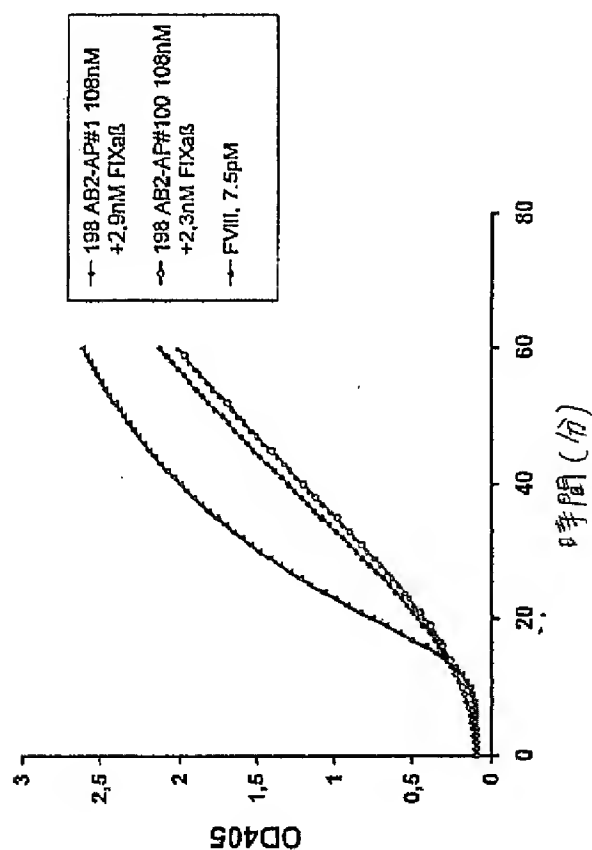


Fig. 27

pelB- 4-9^u-

+1 M K Y L L P T A A A G L L L L
 1 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC
 TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT GAG

VH

+1 A A Q P A M A E V K L V E S G
 46 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG
 CGC CGG GTC GGC CGG TAC CGC CTC CAC TTC GAC CAC CTC AGA CCC

+1 G G L V K P G G S L K L S C A
 91 GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA
 CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG AGG ACA CGT

+1 A S G F T F S S Y T M S W V R
 136 GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC
 CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA TCG ATA TGG TAC AGA ACC CAA GCG

+1 Q T P E K R L E W V A T I S S
 181 CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT
 GTC TGA GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TGG TAA TCA TCA

+1 G G S S T Y Y P D S V K G R F
 226 GGN GGT AGT TCC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC
 CCN CCA TCA AGG TGG ATG ATA GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG

+1 T I S R D N A K N T L Y L Q M
 271 ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG
 TGG TAG AGG TCT CTG TTA CGG TTC TTG TGG GAC ATG GAC GTT TAC

+1 S S L R S E D T A M Y Y C T R
 316 AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA
 TCG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGT CGG TAC ATA ATG ACA TGT TCT

+1 E G G G F T V N W Y F D V W G
 361 GAG GGG GGT GGT TTC ACC GTC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC
 CTC CCC CCA CCA AAG TGG CAG TTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG

4-10^u-

+1 A G T S V T V S S G G G S G
 406 GCA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT
 CGT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT CCA CCT CCG CCA AGT CCA

VL

+1 G R A S G G G G S D I V L T Q
 451 GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACA CAG
 CCC GCG CGG AGA CCG CCA CCG CCT AGC CTG TAA CAC GAC TGT GTC

Fig. 2P-1

(28の77番)

+1 X P A S L A V S L G Q R A T I
496 TNT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA
ANA GGT CGA AGA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CGG TGG TAT

+1 S C R A S E S V D S Y G Y N F
541 TCN TGC AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT
AGN ACG TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG ATA TTA AAA

+1 M H W Y Q Q I P G Q P P K L L
586 ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC
TAC GTG ACC ATA GTC GTC TAT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG

+1 I Y R A S N L E S G I P A R F
631 ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC
TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTC AGA CCC TAG GGA CGG TCC AAG

+1 S G S G S R T D F T L T I N P
676 AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT
TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG GAG TGG TAA TTA GGA

+1 V E A D D V A T Y Y C Q Q S N
721 GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT
CAC CTC CGA CTA CTA CAA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA

+1 E D P L T F G T G T R L E I K
766 GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA
CTC CTA GGC GAG TGC AAG CCA TGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT

スーパー

ヘンジ

ヘリックス

+1 R A A A P K P S T P P G S S R
811 CGG GCG GCC GCA CCG AAG CCT TCC ACT CCG CCC GGG TCT TCC CGT
GCC CGC CGG CGT GGC TTC GGA AGG TGA GGC GGG CCC AGA AGG GCA

+1 M K Q L E D K V E E L L S K N
856 ATG AAA CAG CTG GAA GAC AAA GTA GAG GAG CTC CTT AGC AAG AAC
TAC TTT GTC GAC CTT CTG TTT CAT CTC CTC GAG GAA TCG TTC TTG

+1 Y H L E N E V A R L K K L V G
901 TAC CAT CTA GAA AAC GAG GTA GCT CGT CTG AAA AAG CTT GTT GGT
ATG GTA GAT CTT TTG CTC CAT CGA GCA GAC TTT TTC GAA CAA CCA

His-97"

+1 E R G G H H H H H *
946 GAA CGT GGT GGT CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA
CTT GCA CCA CCA GTG GTA GTG GTA GTG GTA ATT

Fig. 28-2

PelB- 11-9"-
 +1 M K Y L L P T A A A G L L L
 1 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA
 TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT

 +1 L A A Q P A M A | VH
 43 CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT CAG CTT CAG CAG
 GAG CGC CGG GTC GGC CGG TAC CGG CTC CAA GTC GAA GTC GTC

 +1 S G P E L V K P G A S V K I
 85 TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCC GGG GCC TCA GTG AAG ATT
 AGA CCT GGA CTC GAC CAC TTC GGG CCC CGG AGT CAC TTC TAA

 +1 S C K A S G Y A F S S S W M
 127 TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG
 AGG ACG TTT CGA AGA CCG ATG CGT AAG TCA TCG AGA ACC TAC

 +1 N W V K Q R P G Q G L E W I
 169 AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT
 TTG ACC CAC TTC GTC TCC GGA CCT GTC CCA GAA CTC ACC TAA

 +1 G R I Y P G N G D T N Y N G
 211 GGA CGG ATT TAT CCT GGA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG
 CCT GCC TAA ATA GGA CCT TTA CCT CTA TGA TTG ATG TTA CCC

 +1 K F K G K A T L T A D K S S
 253 AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC
 TTC AAG TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG

 +1 S T A Y M Q L S S L T S V D
 295 AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC
 TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG TCG TCG GAC TGG AGA CAC CTG

 +1 S A V Y F C A D G N V Y Y Y
 337 TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA GAT GGT AAC GTA TAT TAC TAT
 AGA CGC CAG ATA AAG ACA CGT CTA CCA TTG CAT ATA ATG ATA

 +1 A M D Y W G Q G T S V T V S
 379 GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC
 CGA TAC CTG ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG

 11-10-
 +1 S G G G G S G G R A S G G G
 421 TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC
 AGT CCA CCT CCG CCA AGT CCA CCC GCG CGG AGA CCG CCA CCG

 VL
 +1 G S Q I V L T Q S P A S L A
 463 GGA TCG CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCT GCT TCC TTA GCT
 CCT AGC GTT TAA CAA GAG TGG GTC AGA GGA CGA AGG AAT CGA

Fig. 29-1

(29の77%)

+1 V S L G Q R A T I S C R A S
505 GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC
CAT AGA GAC CCC GTC TCC CGG TGG TAG AGT ACG TCC CGG TCG

+1 K S V S T S G Y S Y M H W Y
547 AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC
TTT TCA CAG TCA TGT AGA CCG ATA TCA ATA TAC GTG ACC ATG

589 +1 Q Q K P G Q P P K L L I Y L
 CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT
 GTT GTC TTT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GAA

+1 A S N L E S G V P A R F S G
631 GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC
CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC CAG GGA CGG TCC AAG TCA CCG

	+1	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V
673		AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG
		TCA	CCC	AGA	CCC	TGT	CTG	AAG	TGG	GAG	TTG	TAG	GTA	GGA	CAC

	+1	E	E	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	H	S	R
715		GAG	GAG	GAG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	CAG	CAC	AGT	AGG
		CTC	CTC	CTC	CTA	CGA	CGT	TGG	ATA	ATG	ACA	GTC	GTG	TCA	TCC

+1 E L P R T F G G G T K L E I
757 GAG CTT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC
CTC GAA GGA GCC TGC AAG CCA CCT CCG TGG TTC GAC CTT TAG

		ヌー-サー				アルカリ性ホスファターゼ											
	+1	K	R	A	A	A	A	R	A	P	E	M	T	V	L		
799	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	GCC	CGG	GCA	CCA	GAA	ATG	CCT	GTT	CTG			
	TTT	GCC	CGC	CGG	CGT	CGG	GCC	CGT	GGT	CTT	TAC	GGA	CAA	GAC			

+1 E N R A A Q G D I T A P G G
841 GAA AAC CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT
CTT TTG GCC CGA CGA GTC CCG CTA TAA TGA CGT GGG CCG CCA

+1 A R R L T G D Q T A A L R D
883 GCT CGC CGT TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC GCT CTG CGT GAT
CGA GCG GCA AAT TGC CCA CTA GTC TGA CGG CGA GAC GCA CTA

+1 S L S D K P A K N I I L L I
925 TCT CTT AGC GAT AAA CCT GCA AAA AAT ATT ATT TTG CTG ATT
AGA GAA TCG CTA TTT GGA CGT TTT TTA TAA TAA AAC GAC TAA

+1 G D G M G D S E I T A A R N
967 GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT ACT GCC GCA CGT AAT
CCG CTA CCC TAC CCC CTG AGC CTT TAA TGA CGG CGT GCA TTA

Fig. 29-2

(図29のつぎ)

```

+1 Y A E G A G G F F K G I D A
1009 TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT GCC
      ATA CGG CTT CCA CGC CCG CCG AAA AAA TTT CCA TAT CTA CGG

+1 L P L T G Q Y T H Y A L N K
1051 TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA
      AAT GGC GAA TGG CCC GTT ATG TGA GTG ATA CGC GAC TTA TTT

+1 K T G K P D Y V T D S A A S
1093 AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA
      TTT TGG CCG TTT GGC CTG ATG CAG TGG CTG AGC CGA CGT AGT

+1 A T A W S T G V K T Y N G A
1135 GCA ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG
      CGT TGG CGG ACC AGT TGG CCA CAG TTT TGG ATA TTG CCG CGC

+1 L G V D I H E K D H P T I L
1177 CTG GGC GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG
      GAC CCG CAG CTA TAA GTG CTT TTT CTA GTG GGT TGC TAA GAC

+1 E M A K A A G L A T G N V S
1219 GAA ATG GCA AAA GCC GCA GGT CTG GCG ACC GGT AAC GTT TCT
      CTT TAC CGT TTT CGG CGT CCA GAC CGC TGG CCA TTG CAA AGA

+1 T A E L Q D A T P A A L V A
1261 ACC GCA GAG TTG CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA
      TGG CGT CTC AAC GTC CTA CGG TGC GGG CGA CGC GAC CAC CGT

+1 H V T S R K C Y G F S A T S
1303 CAT GTG ACC TCG CGC AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT
      GTA CAC TGG AGC GCG TTT ACG ATG CCA GGC TCG CGC TGG TCA

+1 E K C P G N A L E K G G K G
1345 GAA AAA TGT CCG GGT AAC GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA
      CTT TTT ACA GGC CCA TTG CGA GAC CTT TTT CCG CCT TTT CCT

+1 S I T E Q L L N A R A D V T
1387 TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG
      AGC TAA TGG CTT GTC GAC GAA TTG CGA GCA CGG CTG CAA TGC

+1 L G G G A K T F A E T A T A
1429 CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT GCT GAA ACG GCA ACC GCT
      GAA CCG CCG CCG CGT TTT TGG AAA CGA CTT TGC CGT TGG CGA

+1 G E W Q G K T L R E Q A Q A
1471 GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT GAA CAG GCA CAG GCG
      CCA CTT ACC GTC CCT TTT TGC GAC GCA CTT GTC CGT GTC CGC

```

Fig. 29-3

(図 29 の 77 行)

```

+1 R G Y Q L V S D A A S L N S
1513 CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC TCA CTG AAT TCG
      GCA CCA ATA GTC AAC CAC TCG CTA CGA CGG AGT GAC TTA AGC

+1 V T E A N Q Q K P L L G L F
1555 GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT GGC CTG TTT
      CAC TGC CTT CGC TTA GTC GTT TTT GGG GAC GAA CCG GAC AAA

+1 A D G N M P V R W L G P K A
1597 GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG AAA GCA
      CGA CTG CCG TTA TAC GGT CAC GCG ACC GAT CCT GGC TTT CGT

+1 T Y H G N I D K P A V T C T
1639 ACG TAC CAT GGC AAT ATC GAT AAG CCC GCA GTC ACC TGT ACG
      TGC ATG GTA CCG TTA TAG CTA TTC GGG CGT CAG TGG ACA TGC

+1 P N P Q R N D S V P T L A Q
1681 CCA AAT CCG CAA CGT AAT GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG
      GGT TTA GGC GTT GCA TTA CTG TCA CAT GGT TGG GAC CGC GTC

+1 M T D K A I E L L S K N E K
1723 ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA
      TAC TGG CTG TTT CGG TAA CTT AAC AAC TCA TTT TTA CTC TTT

+1 G F F L Q V E G A S I D K Q
1765 GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT GCG TCA ATC GAT AAA CAG
      CCG AAA AAG GAC GTT CAA CTT CCA CGC AGT TAG CTA TTT GTC

+1 D H A A N P C G Q I G E T V
1807 GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA ATT GGC GAG ACG GTC
      CTA GTA CGA CGC TTA GGA ACA CCC GTT TAA CCG CTC TGC CAG

+1 D L D E A V Q R A L E F A K
1849 GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG GAA TTC GCT AAA
      CTA GAG CTA CTT CGG CAT GTT GCC CGC GAC CTT AAG CGA TTT

+1 K E G N T L V I V T A D H A
1891 AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT GAT CAC GCC
      TTC CTC CCA TTG TGC GAC CAG TAT CAG TGG CGA CTA GTG CGG

+1 H A S Q I V A P D T K A P G
1933 CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT CCG GGC
      GTG CGG TCG GTC TAA CAA CGC GGC CTA TGG TTT CGA GGC CCG

+1 L T Q A L N T K D G A V M V
1975 CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG GTG
      GAG TGG GTC CGC GAT TTA TGG TTT CTA CCG CGT CAC TAC CAC

```

Fig. 29-4

(図 29 の 7 行)

```

+1  M   S   Y   G   N   S   E   E   D   S   Q   E   H   T
2017 ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC
      TAC TCA ATG CCC TTG AGG CTT CTC CTA AGT GTT CTT GTA TGG

+1  G   S   Q   L   R   I   A   A   Y   G   P   H   A   A
2059 GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC
      CCG TCA GTC AAC GCA TAA CGC CGC ATA CCG GGC GTA CGG CGG

+1  N   V   V   G   L   T   D   Q   T   D   L   F   Y   T
2101 AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC
      TTA CAA CAA CCT GAC TGG CTG GTC TGG CTA GAG AAG ATG TGG

+1  M   K   A   A   L   G   D   I   A   H   H   H   H   H
2143 ATG AAA GCC GCT CTG GGG GAT ATC GCA CAC CAT CAC CAT CAC
      TAC TTT CGG CGA GAC CCC CTA TAG CGT GTG GTA GTG GTA GTG

+1  H   *
2185 CAT TAA
      GTA ATT
  
```

Fig. 29-5

PelB- β - γ
 +1 M K Y L L P T A A A G L L L L
 1 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC
 TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT GAG

+1 A A Q P A M A | VH
 45 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG | E V Q L Q Q S G
 CGC CGG GTC GGC CGG TAC CGC | GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GGA
 CTC CAA GTC GAA GTC GTC AGA CCT

+1 P E L V K P G A S V K I S C K
 91 CCT GAG CTG GTG AAG CCC GGG GCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA
 GGA CTC GAC CAC TTC GGG CCC CGG AGT CAC TTC TAA AGG ACG TTT

+1 A S G Y A F S S S W M N W V K
 136 GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG AAG
 CGA AGA CCG ATG CGT AAG TCA TCG AGA ACC TAC TTG ACC CAC TTC

+1 Q R P G Q G L E W I G R I Y P
 181 CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT
 GTC TCC GGA CCT GTC CCA GAA CTC ACC TAA CCT GCC TAA ATA GGA

+1 G N G D T N Y N G K F K G K A
 226 GGA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC
 CCT TTA CCT CTA TGA TTG ATG TTA CCC TTC AAG TTC CCG TTC CGG

+1 T L T A D K S S S T A Y M Q L
 271 ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC
 TGT GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG

+1 S S L T S V D S A V Y F C A D
 316 AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA GAT
 TCG TCG GAC TGG AGA CAC CTG AGA CGC CAG ATA AAG ACA CGT CTA

+1 G N V Y Y Y A M D Y W G Q G T
 361 GGT AAC GTA TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC
 CCA TTG CAT ATA ATG ATA CGA TAC CTG ATG ACC CCA GTT CCT TGG

+1 S V T V S S | β - γ
 406 TCA GTC ACC GTC TCC TCA | G G G G S G G R A
 AGT CAG TGG CAG AGG AGT | CCA CCT CCG CCA AGT CCA CCC GCG CGG

Fig. 30-1

(図 30 の つづき)

	+1	S	G	G	G	G	S	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
451	TCT	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	CAA	ATT	GTT	CTC	ACC	CAG	TCT	CCT	GCT	
	AGA	CCG	CCA	CCG	CCT	AGC	GTT	TAA	CAA	GAG	TGG	GTC	AGA	GGA	CGA	

+1 S L A V S L G Q R A T I S C R
496 TCZ TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG
AGG AAT CGA CAT AGA GAC CCC GTC TCC CGG TGG TAG AGT ACG TCC

+1 A S K S V S T S G Y S Y M H W
541 GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG
CGG TCG TTT TCA CAG TCA TGT AGA CCG ATA TCA ATA TAC GTG ACC

+1 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L
586 TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT
ATG GTT GTC TTT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GAA

+1 A S N L E S G V P A R F S G S
631 GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT
CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC CAG GGA CGE TCC AAG TCA CCG TCA

+1 G S G T D F T L N I H P V E E
676 GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG
CCC AGA CCC TGT CTG AAG TGG GAG TTG TAG GTA GGA CAC CTC CTC

	+1	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	H	S	R	E	L	P
721		GAG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	CAG	CAC	AGT	AGG	GAG	CTT	CCT
		CTC	CTA	CGA	CGT	TGG	ATA	ATG	ACA	GTC	GTG	TCA	TCC	CTC	GAA	GGA

	+1	R	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R		A	A
766	CGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG		CGC	GCC	
	GCC	TGC	AAG	CCA	CCT	CCG	TGG	TTC	GAC	CTT	TAG	TTT	GCC		CGC	CGG	

		エンジ										ヘリックス				
	+1	A	P	K	P	S	T	P	P	G	S	S	R	M	K	Q
811	GCA	CCG	AAG	CCT	TCC	ACT	CCG	CCC	GGG	TCT	TCC	CGT	ATG	AAA	CAG	
	CGT	GGC	TTC	GGA	AGG	TGA	GGC	GGG	CCC	AGA	AGG	GCA	TAC	TTT	GTC	

+1 L E D K V E E L L S K N Y H L
856 CTG GAA GAC AAA GTA GAG GAG CTC CTT AGC AAG AAC TAC CAT CTA
GAC CTT CTG TTT CAT CTC CTC GAG GAA TCG TTC TTG ATG GTA GAT

Fig. 3a-2

(図30-3の逆)

スパーサー		His-タグ						
+1	G	H	H	H	H	H	H	*
946	GGT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	TAA
	CCA	GTG	GTA	GTG	GTA	GTG	GTA	ATT

Fig. 30-3

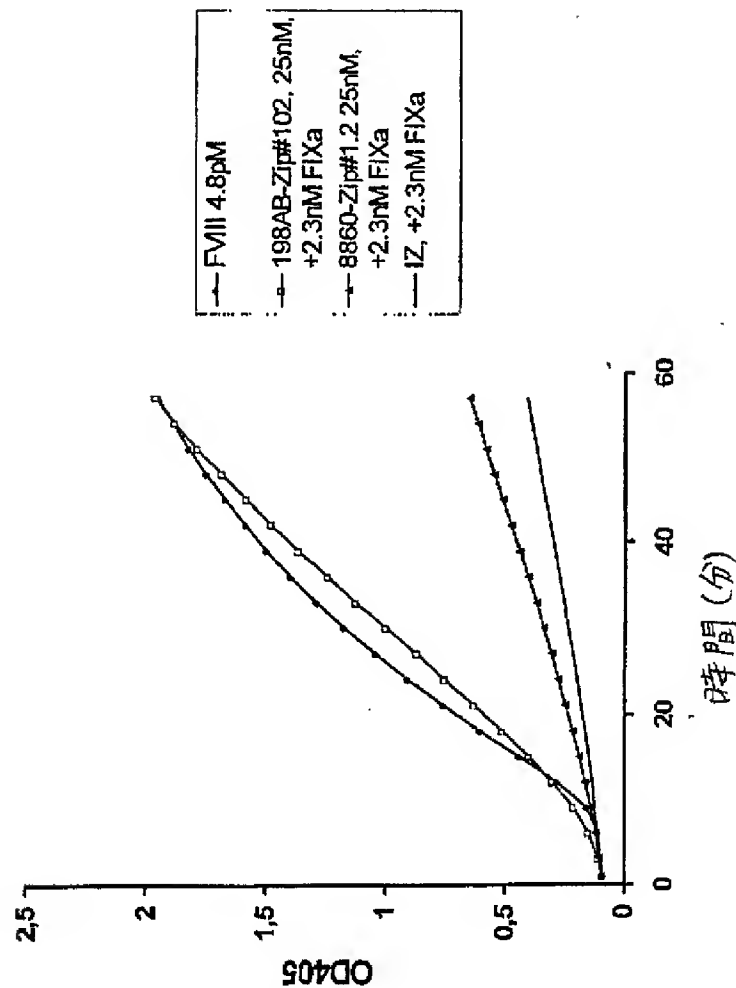
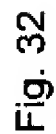


Fig. 31



HindIII
~~~~~

2206 CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTC CAT GAA AAT  
GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAG GTA CTT TTA

PelB-4-9"-  
M K Y L L P T

2251 TCT ATT TCA AGG AGA CAG TCA TAA TGA AAT ACC TAT TGC CTA CGG  
AGA TAA AGT TCC TCT GTC AGT ATT ACT TTA TGG ATA ACG GAT GCC

A A A G L L L L A A Q P A M A

SfiI  
~~~~~

2296 CAG CCG CTG GAT TGT TAT TAC TCG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CCC
GTC GGC GAC CTA ACA ATA ATG AGC GCC GGG TCG GCC GGT ACC GGG

ポリリンカー:
Q V Q L Q A R L Q V D L E I K

AscI
~~~~~

2341 AGG TGC AGC TGC AGG CGC GCC TGC AGG TCG ACC TCG AGA TCA AAC  
TCC ACG TCG ACG TCC GCG CGG ACG TCC AGC TGG AGC ICT AGT TTG

スパーサー  
R A A A
Myc-99"  
E Q K L I S E E D L N

NotI  
~~~~~

2386 GGG CGG CCG CAG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGA ATG
CCC GCC GGC GTC TTG TTT TTG AGT AGA GTC TTC TCC TAG ACT TAC

スパーサー
G A A
His 99"
H H H H H H * *

EcoRI
~~~~~

2431 GGG CGG CAC ATC ACC ATC ACC ATC ACT AAT AAG AAT TCA CTG GCC  
CCC GCC GTG TAG TGG TAG TGG TAG TGA TTA TTC TTA AGT GAC CGG

Fig. 33

PelB- 11-9"-  
 +1 M K Y L L P T A A A G L L L L  
 1 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC  
 TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT GAG  
  
 +1 A A Q P A M A | VH E V K L V E S G  
 46 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG  
 CGC CGG GTC GGC CGG TAC CGG CTC CAC TTC GAC CAC CTC AGA CCC  
  
 +1 G G L V K P G G S L K L S C A  
 91 GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA  
 CCT CCG AAT CAC TTC GGA CCT CCC AGG GAC TTT GAG AGG ACA CGT  
  
 +1 A S G F T F S S Y T M S W V R  
 136 GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC  
 CGG AGA CCT AAG TGA AAG TCA TCG ATA TGG TAC AGA ACC CAA GCG  
  
 +1 Q T P E K R L E W V A T I S S  
 181 CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT  
 GTC TGA GGC CTC TTC TCC GAC CTC ACC CAG CGT TGG TAA TCA TCA  
  
 +1 G G S S T Y Y P D S V K G R F  
 226 GGN GGT AGT TCC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC  
 CCN CCA TCA AGG TGG ATG ATA GGT CTG TCA CAC TTC CCG GCT AAG  
  
 +1 T I S R D N A K N T L Y L Q M  
 271 ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG  
 TGG TAG AGG TCT CTG TTA CGG TTC TTG TGG GAC ATG GAC GTT TAC  
  
 +1 S S L R S E D T A M Y Y C T R  
 316 AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA  
 TCG TCA GAC TCC AGA CTC CTG TGT CGG TAC ATA ATG ACA TGT TCT  
  
 +1 E G G G F T V N W Y F D V W G  
 361 GAG GGG GGT GGT TTC ACC GTC AAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC  
 CTC CCC CCA CCA AAG TGG CAG TTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG  
  
 +1 A G T S V T V S S | 11-9"- G G G G S G  
 406 GCA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGT  
 CGT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT CCA CCT CCG CCA AGT CCA  
  
 +1 G R A S G G G G S | VK D I V L T Q  
 451 GGG CGC GCC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG CTG ACA CAG

Fig. 34-1

(図 34-2)

```

CCC GCG CGG AGA CCG CCA CCG CCT AGC CTG TAA CAC GAC TGT GTC

+1 S P A S L A V S L G Q R A T I
496 TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA
    AGA GGT CGA AGA AAC CGA CAC AGA GAT CCC GTC TCC CGG TGG TAT

+1 S C R A S E S V D S Y G Y N F
541 TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC TAT AAT TTT
    AGG ACG TCT CGG TCA CTT TCA CAA CTA TCA ATA CCG ATA TTA AAA

+1 M H W Y Q Q I P G Q P P K L L
586 ATG CAC TGG TAT CAG CAG ATA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC
    TAC GTG ACC ATA GTC GTC TAT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG

+1 I Y R A S N L E S G I P A R F
631 ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAG TCT GGG ATC CCT GCC AGG TTC
    TAG ATA GCA CGT AGG TTG GAT CTC AGA CCC TAG GGA CGG TCC AAG

+1 S G S G S R T D F T L T I N P
676 AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT AAT CCT
    TCA CCG TCA CCC AGA TCC TGT CTG AAG TGG GAG TGG TAA TTA GGA

+1 V E A D D V A T Y Y C Q Q S N
721 GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT
    CAC CTC CGA CTA CTA CAA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTT TCA TTA

+1 E D P L T F G T G T R L E I K
766 GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT ACT GGG ACC AGA CTG GAA ATA AAA
    CTC CTA GGC GAG TGC AAG CCA TGA CCC TGG TCT GAC CTT TAT TTT

      210-4-      Myc-77"
+1 R | A A A | E Q K L I S E E D L N
811 CGG | GCG GCC GCA | GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
    GCC | CGC CGG CGT | CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TTA

      210-4-      His 77"
+1 G | A A | H H H H H H * *
856 GGG | GCG GCA | CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA TAA
    CCC | CGC CGT | GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT ATT

```

Fig. 34-2



PalB- 4-7<sup>11</sup>-

```

+1 M K Y L L P T A A A G L L L L
1  ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC
   TAC TTT ATG GAT AAC GGA TGC CGT CGG CGA CCT AAC AAT AAT GAG

+1 A A Q P A M A | VH
46 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC | GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GGA
   CGC CGG GTC GGC CGG TAC CGG | CTC CAA GTC GAA GTC GTC AGA CCT

+1 P E L V K P G A S V K I S C K
91 CCT GAG CTG GTG AAG CCC GGG GCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC TAA
   GGA CTC GAC CAC TTC GGG CCC CGG AGT CAC TTC TAA AGG ACG TTT

+1 A S G Y A F S S S W M N W V K
136 GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG AAG
   CGA AGA CCG ATG CGT AAG TCA TCG AGA ACC TAC TTG ACC CAC TTC

+1 Q R P G Q G L E W I G R I Y P
181 CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT
   GTC TCC GGA CCT GTC CCA GAA CTC ACC TAA CCT GCC TAA ATA GGA

+1 G N G D T N Y N G K F K G K A
226 GGA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC
   CCT TTA CCT CTA TGA TTG ATG TTA CCC TTC AAG TTC CCG TTC CGG

+1 T L T A D K S S S T A Y M Q L
271 ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC
   TGT GAC TGA CGT CTG TTT AGG AGG TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG

+1 S S L T S V D S A V Y F C A D
316 AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA GAT
   TCG TCG GAC TGG AGA CAC CTG AGA CGC CAG ATA AAG ACA CGT CTA

+1 G N V Y Y Y A M D Y W G Q G T
361 GGT AAC GTA TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC
   CCA TTG CAT ATA ATG ATA CGA TAC CTG ATG ACC CCA GTT CCT TGG

+1 S V T V S S | 4-711-
406 TCA GTC ACC GTC TCC TCA | GGT GGA GGC GGT TCA GGT GGG CGC GCC
   AGT CAG TGG CAG AGG AGT | CCA CCT CCG CCA AGT CCA CCC GCG CGG

+1 S G G G G S | VL
451 TCT GGC GGT GGC GGA TCG | CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCT GCT
   AGA CCG CCA CCG CCT AGC | GTT TAA CAA GAG TGG GTC AGA GGA CGA

```

Fig. 35-1

(図35の77番)

```

+1 S L A V S L G Q R A T I S C R
496 TCC TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG
    AGG AAT CGA CAT AGA GAC CCC GTC TCC CGG TGG TAG AGT ACG TCC

+1 A S K S V S T S G Y S Y M H W
541 GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG
    CGG TCG TTT TCA CAG TCA TGT AGA CCG ATA TCA ATA TAC GTG ACC

+1 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L
586 TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT
    ATG GTT GTC TTT GGT CCT GTC GGT GGG TTT GAG GAG TAG ATA GAA

+1 A S N L E S G V P A R F S G S
631 GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT
    CGT AGG TTG GAT CTT AGA CCC CAG GGA CGG TCC AAG TCA CCG TCA

+1 G S G T D F T L N I H P V E E
676 GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG
    CCC AGA CCC TGT CTG AAG TGG GAG TTG TAG GTA GGA CAC CTC CTC

+1 E D A A T Y Y C Q H S R E L P
721 GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAG CTT CCT
    CTC CTA CGA CGT TGG ATA ATG ACA GTC GTG TCA TCC CTC GAA GGA

+1 R T F G G G T K L E I K R
766 CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG
    GCC TGC AAG CCA CCT CCG TGG TTC GAC CTT TAG TTT GCC

+1 A E Q K L I S E E D L ; N G
811 GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG
    CGT CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TTA CCC

+1 H H H H H H *
856 CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA
    GTA GTG GTA GTG GTA GTG ATT
  
```

Fig. 35-2

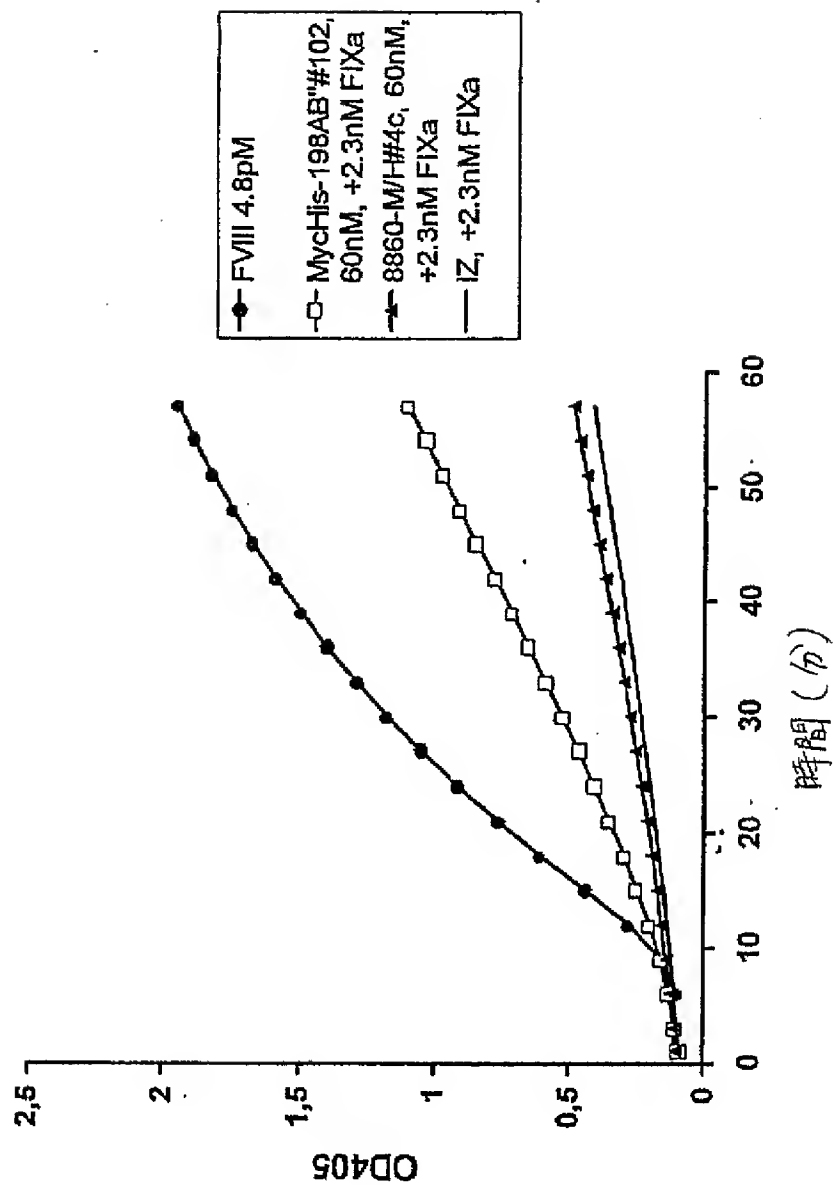


Fig. 36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 00/08936

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| IPC 7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | C12N15/13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | C07K16/40 C12N5/20 A61K39/395 A61P7/04             |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| B. FIELDS SEARCHED                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| IPC 7 C07K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, EMBASE, MEDLINE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No.                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | NILSSON I M ET AL: "Induction of split tolerance and clinical cure in high-responding hemophiliacs with factor IX antibodies"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 83, no. 23, 1986, pages 9169-9173, XP002164050<br>1986<br>ISSN: 0027-8424<br>abstract<br>page 9169, column 2, paragraph 2 | 1-24                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | WO 95 13300 A (EZBAN RASMUSSEN MIRELLA ;KJALKE MARIANNE (DK); NOVONORDISK AS (DK)) 18 May 1995 (1995-05-18)<br>claims 1-12<br>Seq. No. 2                                                                                                                                                                                              | 1-24                                               |
| -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.<br><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| * Special categories of cited documents:<br>'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>'E' earlier document but published on or after the international filing date<br>'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>'Z' document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                    |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Date of mailing of the international search report |
| 27 March 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 11/04/2001                                         |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Authorized officer<br><br>Muller-Thomalla, K       |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Int. Application No.  
PCT/EP 00/08936

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A          | <p>BAJAJ S P ET AL: "A monoclonal antibody to factor IX that inhibits the factor VIII:Ca potentiation of factor X activation"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC...US, vol. 260, no. 21, 25 September 1985 (1985-09-25), pages 11574-11576, 11578-11580, XP002922137</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>abstract</p> | 1-24                  |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08936

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 20-22 and 24 (insofar as an in vivo method is concerned) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/08936

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9513300 A                              | 18-05-1995          | AU 8140094 A               | 29-05-1995          |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | F I     | テーマコード <sup>8</sup> (参考) |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------------|
| C 1 2 N                  | 5/10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | C 1 2 P | 21/08                    |
|                          | 15/02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | C 1 2 N | 15/00                    |
| C 1 2 P                  | 21/02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         | Z N A A                  |
| // C 1 2 P               | 21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         | B                        |
|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 5/00    | B                        |
| (81)指定国                  | EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW |         |                          |
| (72)発明者                  | ファルクナー, ファルコーギュンター<br>オーストリア国 アー2304 オルト/ド<br>ナウ, ノイジードルツアイレ 76アー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |                          |
| (72)発明者                  | ドルナー, フリードリッヒ<br>オーストリア国 アー1230 ウィーン,<br>ペーターリーニガッセ 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |                          |
| (72)発明者                  | シュバルツ, ハンス ペーター<br>オーストリア国 アー1180 ウィーン,<br>シンドラーガッセ 38                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |                          |
| Fターム(参考)                 | 4B024 AA01 BA44 BA61 CA02 CA10<br>DA02 HA03<br>4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24<br>DA01<br>4B065 AA90 AB01 AB04 CA24 CA25<br>CA44<br>4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB33<br>BB35 BB36 BB37 CC32 DD33<br>DD34 DD62 EE01 GG01<br>4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75<br>DA76 EA24 FA74                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |                          |